

258910

MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI

BACTERIOLOGIE ȘI INFRAMICROBIOLOGIE

Manual pentru clasa a XII-a, licee sanitare



P
MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI ÎNVĂȚĂMÎNTULUI

Dr. GH. DIMACHE • Dr. VIRGINIA DIMACHE • Dr. V. RADU • Dr. C. CERNESCU

BACTERIOLOGIE ȘI INFRAMICROBIOLOGIE

Manual pentru clasa a XII-a, licee sanitare

B A C T E R I O L O G I E

Tema 1

NOTIUNI GENERALE DESPRE BACTERIOLOGIE ȘI INFRAMICROBIOLOGIE

1.1. OBIECTUL BACTERIOLOGIEI ȘI INFRAMICROBIOLOGIEI

Microbiologia este știința care se ocupă cu studiul microorganismelor.

Microorganismele sînt cele mai mici viețuitoare cunoscute, ale căror dimensiuni se măsoară în microni și milimicroni. Din această cauză ele nu pot fi văzute decît cu ajutorul microscopului optic sau, în cazul celor foarte mici, numai cu microscopul electronic.

Microorganismele sînt de două feluri : *patogene*, care produc îmbolnăviri și *nepatogene*, care nu afectează decît ocazional omul.

Microbiologia medicală este o ramură a microbiologiei generale care se ocupă cu studiul microorganismelor patogene pentru om.

În sens larg, microbiologia include : **bacteriologia** (studiul bacteriilor), **virusologia** (studiul virusurilor), **micologia** (studiul ciupercilor parazite) și **protozoologia medicală** (studiul paraziților microscopici).

Bolile produse de bacterii poartă denumirea generală de **bacterioze**, iar cele produse de virusuri, **viroze**.

Microbiologia medicală oferă un suport indubitabil diagnosticului bolilor infecțioase, iar microbiologii au contribuit în mod decisiv la descoperirea mijloacelor moderne de prevenire și tratament ale acestor boli, care au decimat omenirea de-a lungul mileniilor.

1.2. ISTORICUL MICROBIOLOGIEI MEDICALE

Microbiologia medicală este o știință relativ tînără, care a apărut în secolul trecut, iar dezvoltarea sa a fost și este strîns legată de dezvoltarea științelor naturii, a fizicii și chimiei. La rîndul ei, micro-

biologia a contribuit la dezvoltarea biologiei generale și, mai ales, a geneticii, căreia i-a oferit modele experimentale fundamentale fără de care progresele excepționale realizate astăzi în domeniul cunoașterii eredității și variabilității materiei vii nu ar fi fost posibile.

Bolile infecțioase erau cunoscute din antichitate. Dacă în privința modului de transmitere a infecțiilor au fost făcute unele observații corecte, în schimb, cauza acestora era socotită de origine supranaturală.

Mai târziu, în secolul XVI, G. Fracastorio a emis ipoteza că bolile infecțioase sînt transmise fie prin contactul direct cu un bolnav, fie indirect, prin intermediul aerului și al prafului.

În secolul următor, cînd dezvoltarea tehnicii a luat un mare avînt, un pasionat șlefuitor de lentile olandez, A. van Leeuwenhoek a construit un microscop care mărea de 300 ori și cu ajutorul căruia a văzut pentru prima dată microorganisme pe care le-a descris din punct de vedere morfologic. A combătut teoria generației spontane, care predomina în acele vremuri. Această descoperire a produs un mare interes pentru reluarea cercetărilor și discuțiilor privind originea vieții.

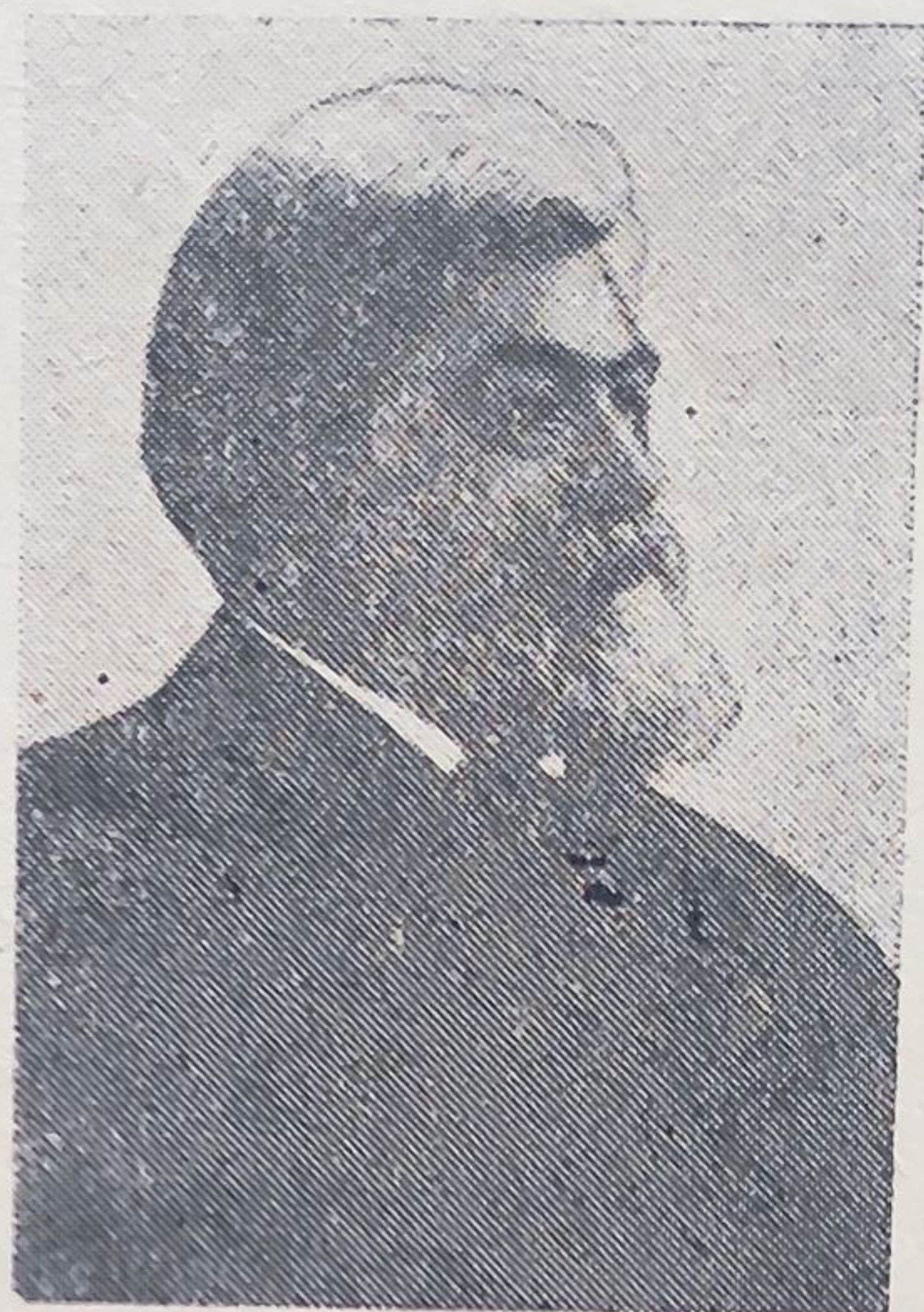


Louis Pasteur

Începînd cu a doua parte a secolului XIX, microbiologia se constituie ca o ramură importantă a biologiei, datorită, în primul rînd, genialului chimist și medic francez Louis Pasteur (1822—1895), care este socotit pe bună dreptate fondatorul acestei științe. El a demonstrat în mod clar falsitatea teoriei generației spontane, a identificat și descris numeroase microorganisme, a făcut legătura cauzală dintre existența acestor microorganisme și boală și a descoperit principiul vaccinării, punînd la punct numeroase vaccinuri, dintre care amintim pe cele folosite împotriva turbării și antraxului.



Victor Babeș



Ioan Cantacuzino

În aceeași perioadă, medicul german Robert Koch a descoperit bacilul tuberculozei și vibrionul holerei, a realizat primele medii de cultură solide pentru izolarea bacteriilor, a perfecționat tehnicile de colorare a microbilor. Prin acestea, el a contribuit în mod substanțial, alături de L. Pasteur, la fondarea microbiologiei.

Trebuie, de asemenea, să menționăm pe Ilia Mecinikov, microbiolog rus, care a demonstrat fenomenul de fagocitoză, ca și pe botanistul rus Dimitri Ivanovski, care, în 1892, a descoperit primul virus, marcând astfel nașterea virusologiei.

În țara noastră, Victor Babeș (1854—1926), coautor al primului tratat de bacteriologie din lume, a descoperit peste 50 de noi specii microbiene, a utilizat pentru prima dată seroterapia și a anticipat descoperirea antibioticelor. Împreună cu Ioan Cantacuzino (1863—1934), creator al școlii naționale de microbiologie și al institutului care-i poartă numele, acești doi mari savanți pot fi socotiți fondatorii microbiologiei moderne românești. Activitatea lor a fost continuată, în mod creator, de Constantin Levaditi, Dimitrie Combiescu, Constantin Ionescu-Mihăești, Ștefan S. Nicolau, Mihai Ciucă și alții, care au avut, de asemenea, o contribuție de seamă la dezvoltarea bacteriologiei și virusologiei.

Tema 2

MORFOLOGIA ȘI FIZIOLOGIA BACTERIILOR

Bacteriile sînt microorganisme unicelulare. Studiul acestora, făcut cu ajutorul microscopului electronic și al unor colorații speciale, a permis identificarea unor structuri diverse, analoge acelor existente în oricare celulă vie.

În ciuda structurii lor unicelulare, bacteriile sînt sediul tuturor funcțiilor biologice vitale.

Celula bacteriană este o entitate morfologică și fiziologică de sine stătătoare.

2.1. FORMA ȘI MODUL DE GRUPARE, DIMENSIUNILE, STRUCTURA ȘI FORMELE DE REZISTENȚĂ ALE BACTERIILOR

Forma și modul de grupare a bacteriilor sînt elemente ce pot fi puse ușor în evidență la microscopul optic, mai ales după colorare. În general, bacteriile pot avea formă : *sferică* (coci), *cilindrică* (bacili), *încurbată* (vibrioni) și *spiralată* sau *elicoidală* (spirili și spirochete) (fig. 1).

Cocii se pot grupa în ciorchine (stafilococi), în lanțuri (streptococi), perechi (diplococi), cîte patru (tetradă) sau în pachete mai mari (sarcină).

La rîndul lor, bacilii pot avea capetele ascuțite (fusiforme), drepte sau rotunjite. De asemenea, ei se pot dispune caracteristic în lanțuri (streptobacili), în palisadă etc.

Dimensiunile bacteriilor sînt microscopice (0,5—6 microni). Cocii au, în general, un diametru de 1 μ , bacilii și vibrionii o grosime de 0,5 μ și o lungime variabilă de 3—5 μ , iar formele spiralate o lungime de 5—20 μ și o grosime de 0,3—0,4 μ .

Structura celulei bacteriene este complexă, fapt ce-i permite să realizeze în mod independent principalele funcții ale unui organism viu (fig. 2).

Nucleul bacterian — nucleoidul — nu are o membrană proprie evidentă. El este constituit dintr-o singură moleculă de ADN, cu un singur cromozom de formă circulară. Nucleul este responsabil de determinarea caracterelor ereditare. La unele bacterii, în citoplasmă se întîlnesc fragmente de material genetic cunoscute sub numele de *epizomi* sau *plasmide* (de exemplu, factorul „R” de rezistență la antibiotice) ce se pot transfera de la o celulă bacteriană la alta.

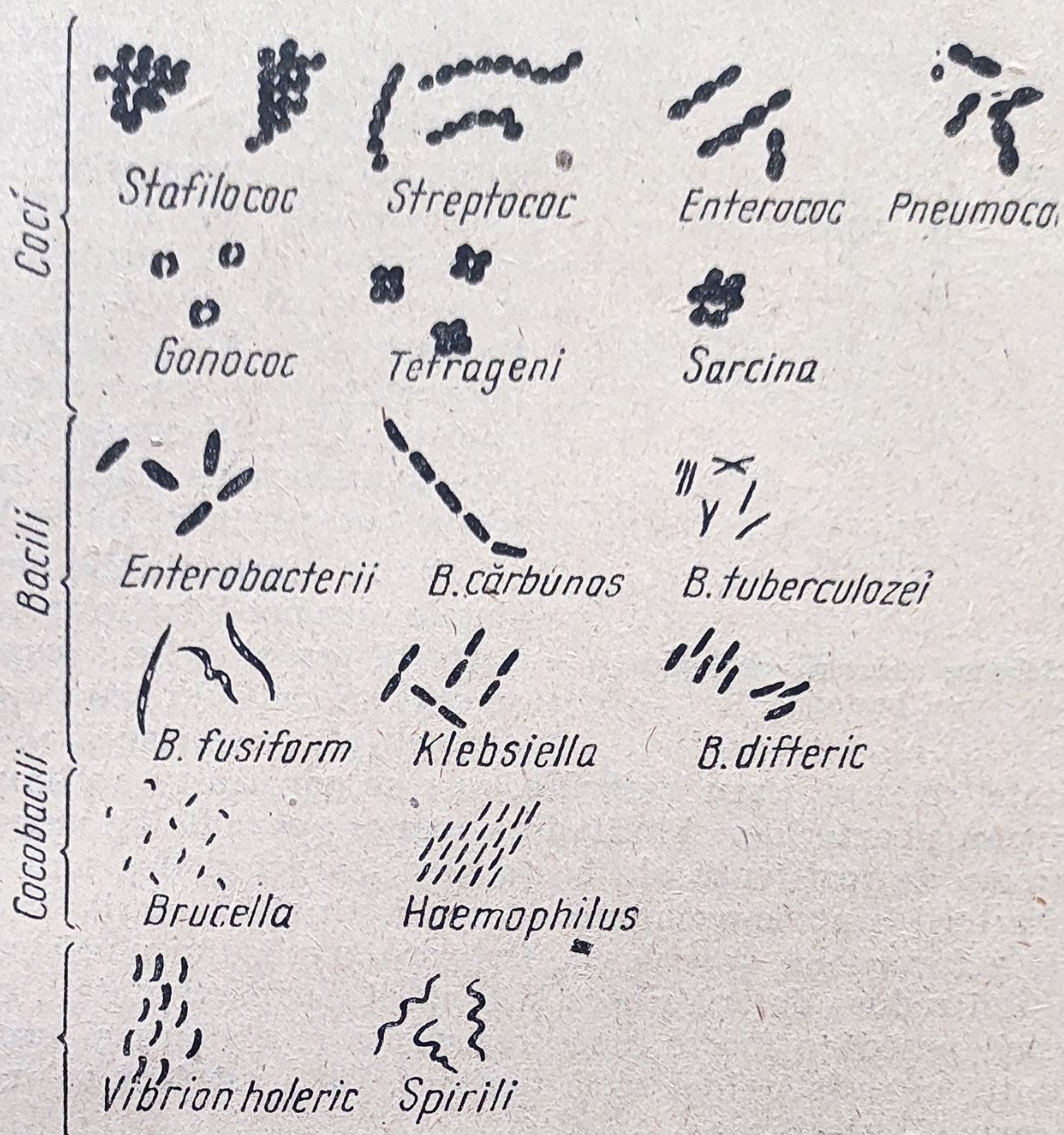


Fig. 1. Forme și moduri de grupare la bacterii.

Citoplasma celulei bacteriene este un sistem coloidal alcătuit din proteine, nucleoproteine, glucide, lipide, apă și săruri minerale. În citoplasmă există unele elemente structurale de mare însemnătate, cum sînt *ribozomii*, al căror rol în sinteza proteinelor este bine cunoscut. De asemenea, se pot întîlni granule citoplasmatică care înmagazinează materiile nutritive de rezervă etc.

Membrana citoplasmatică este alcătuită, în special, din lipide și proteine. Este o membrană semipermeabilă, care permite difuziunea selectivă, printr-un proces activ, a elementelor nutritive din mediul exterior spre citoplasmă și eliminarea produselor de metabolism. Membrana citoplasmatică este sediul a numeroase enzime. Prin plierea sa dă naștere la mezozomi, sisteme membranoase cu rol în diviziunea celulară.

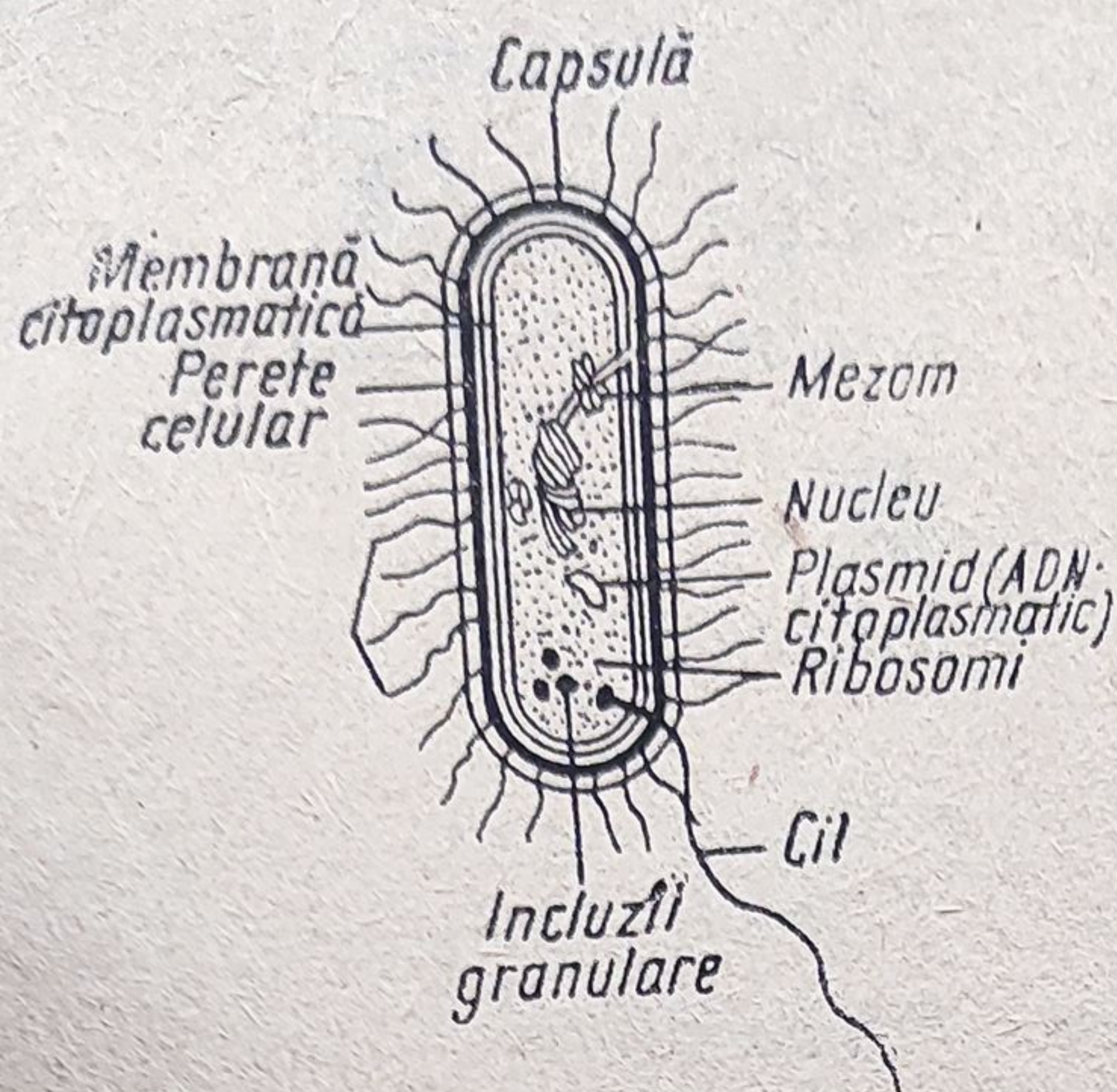


Fig. 2. Schema structurii citologice a unei bacterii.

Peretele celular se prezintă sub două forme principale: la bacteriile Gram-pozitive el este format, mai ales, dintr-un polimer numit mucopeptidă, iar la cele Gram-negative au fost identificate trei straturi, două învelișuri externe formate din lipopolizaharide și lipoproteine și un strat intern, mucopeptidic. Peretele bacterian, prin structura sa rigidă, menține forma caracteristică bacteriei.

Dintre formațiunile extraparietale care pot fi întâlnite la unele bacterii, menționăm: *capsula* și *stratul mucos*, *cilii* sau *flagelii*, cu dispoziție caracteristică și rol în

mobilitate, ca și *pilii* sau *fimbriile*, care se pare că au rol important în conjugarea bacteriilor și în fixarea acestora pe epiteliul mucoaselor.

Formele de rezistență ale bacteriilor, caracteristice numai anumitor bacterii, sînt reprezentate de *spori*. Unele bacterii, în condiții de viață nefavorabile, sporulează. Datorită învelișului pluristratificat, a cantității reduse de apă liberă și a stării de inactivitate a enzimelor, sporii posedă o foarte mare rezistență la căldură și uscăciune. Unii dintre ei rezistă chiar și la fierbere. De acest fapt va trebui să ținem seama la sterilizare.

În condiții favorabile, sporul germinează și bacteria revine la forma sa vegetativă. Aceste condiții favorabile sînt oferite și de organismul uman contaminat, astfel că sporii unor bacterii pot provoca tetanosul, gangrena gazoasă etc.

Mărimea sporului, ca și situarea sa în raport de celula vegetativă (central, terminal, subterminal), sînt elemente importante care orientează diagnosticul morfologic al unei specii bacteriene sporulate.

2.2. NUTRIȚIE, MEDII DE CULTURĂ, ÎNMULȚIRE

Nutriția bacteriană cuprinde totalitatea proceselor metabolice care participă la producerea de substanțe energetice sau de materiale cu rol plastic. Bacteriile își realizează activitatea metabolică prin numeroase mecanisme, folosind surse nutritive extrem de diverse, de la azot molecular, dioxid de carbon, sulf, pînă la substanțele organice cele mai complexe.

IBI „COSMIN” 1981
B.C.U. EMINESCU 1981
1981

În funcție de tipul de nutriție, bacteriile pot fi împărțite în **autotrofe** (utilizează carbonul din compuși anorganici) și **heterotrofe** (utilizează carbonul din substanțe organice).

În raport cu sursa de energie utilizată, microorganismele autotrofe pot fi **fototrofe**, care utilizează energia radiantă (luminoasă) și **chemotrofe**, care utilizează energia ce rezultă din reacțiile biochimice de oxidoreducere.

Bacteriile patogene sînt heterotrofe ; datorită parazitismului, ele și-au pierdut capacitatea de a-și sintetiza singure toate elementele nutritive de care au nevoie. Pentru cultivarea acestor bacterii pe medii artificiale este necesară introducerea în aceste medii a unor factori de creștere, cum sînt unele vitamine (B_1 , B_2 , B_6 , PP etc.), aminoacizi, hematii etc.

Concentrația ionilor de hidrogen (pH) în mediile de cultură reprezintă un factor important pentru bacteriile patogene. Deși unele bacterii suportă limite largi de aciditate și alcalinitate, marea majoritate a bacteriilor patogene pentru om se dezvoltă într-o zonă îngustă de pH, în general, în jurul neutralității.

În general, bacteriile patogene se dezvoltă între 20 și 37°C, dar temperatura optimă este apropiată de temperatura normală a omului (37°C).

În funcție de comportarea față de oxigenul din atmosferă, bacteriile pot fi grupate în patru tipuri respiratorii :

- *bacterii strict aerobe* (bacilul tuberculozei, bacilul cărbunos etc.), care folosesc oxigenul ca acceptor final de hidrogen și, prin urmare, au obligatoriu nevoie de prezența oxigenului atmosferic ;

- *bacterii strict anaerobe* (bacilul tetanic, bacilul botulinic etc.), care se dezvoltă numai în absența oxigenului ;

- *bacterii aerobe, facultativ anaerobe* (stafilococul, bacilul coli etc.), care au posibilitatea să-și adapteze metabolismul în funcție de prezența sau absența oxigenului ;

- *bacterii microaerofile* (spirochete etc.), care tolerează cantități mici de oxigen.

Cunoașterea fiziologiei bacteriilor ne dă posibilitatea să creăm acestora condiții optime de cultivare și să aplicăm unele teste biochimice pentru identificarea lor.

Medii de cultură. Pentru identificarea unei specii bacteriene, examenul microscopic direct al produsului patologic recoltat de la bolnav este de cele mai multe ori insuficient. Precizarea cauzei care a produs boala necesită cultivarea agentului patogen pe un complex de substanțe nutritive adecvate, care alcătuiesc mediile de cultură.

Aceste medii de cultură, pentru a fi corespunzătoare, trebuie să îndeplinească câteva condiții : să conțină substanțele plastice și energetice necesare cultivării microbului însămînțat, să satisfacă cerințele de aerobioză sau anaerobioză ale acestuia, să aibă o concentrație de ioni de hidrogen (pH) optimă și să fie sterile, pentru a permite izolarea în cultură pură a germenului respectiv.

Pe măsura cunoașterii tot mai aprofundate a exigențelor unei bacterii, s-a ajuns la realizarea unor medii de cultură cu o compoziție adecvată și precisă. În unele cazuri s-a ajuns chiar la situația optimă de preparare a unor medii sintetice-standardizate, nemaifiind necesare ingrediente de origine animală sau vegetală a căror compoziție poate varia foarte mult.

În general, mediile de cultură se pot prezenta sub formă lichidă (bulion, apă peptonată etc.) sau solidă (medii în care se încorporează agar).

În funcție de scopul urmărit, mediile de cultură pot fi grupate astfel :

- medii de izolare, care permit izolarea bacteriei dintr-un produs patologic ;

- medii de transport, care permit supraviețuirea anumitor bacterii ce nu pot fi însămînțate imediat după recoltare (de exemplu, mediul Stuart pentru Neisserii, Carry-Blair pentru vibriionul holerice etc.) ;

- medii de îmbogățire, destinate cultivării unor bacterii cu necesități nutritive particulare și care sînt stimulate să crească, în mod special, deoarece numărul lor este redus în produsul patologic în momentul recoltării (de exemplu, bulion cu selenit și mediul Müller-Kauffmann pentru salmonelle) ;

- medii selective, care conțin elemente ce permit creșterea numai a anumitor bacterii dintr-un produs (de exemplu, mediul Wilson-Blair pentru bacilul tific) ;

- medii diferențiale, care conțin substanțe ce pun în evidență unele proprietăți biochimice ale bacteriilor studiate. La rîndul lor, mediile diferențiale pot fi simple (de exemplu, mediul AABTL, care pune în evidență fermentarea lactozei) sau politrope (de exemplu, mediul TSI, care pune în evidență mai multe caractere biochimice).

Inmulțirea bacteriilor se face, în mod obișnuit, prin diviziune directă. La bacili, diviziunea este, de obicei, transversală, iar la coci aceasta se face după unul sau mai multe planuri perpendiculare, succesive, care duc la gruparea caracteristică în perechi, lanțuri sau grămezi. Bacteriile au o viteză de multiplicare extraordinar de mare. În general, intervalul de timp dintre două diviziuni este de 20—30 min.

Există, însă, specii la care generațiile noi apar numai după 9 min sau specii, cum este bacilul tuberculos, la care o nouă diviziune apare după 18 h.

În mediile de cultură dinamică multiplicării populației bacteriene (fig. 3) evoluează astfel :

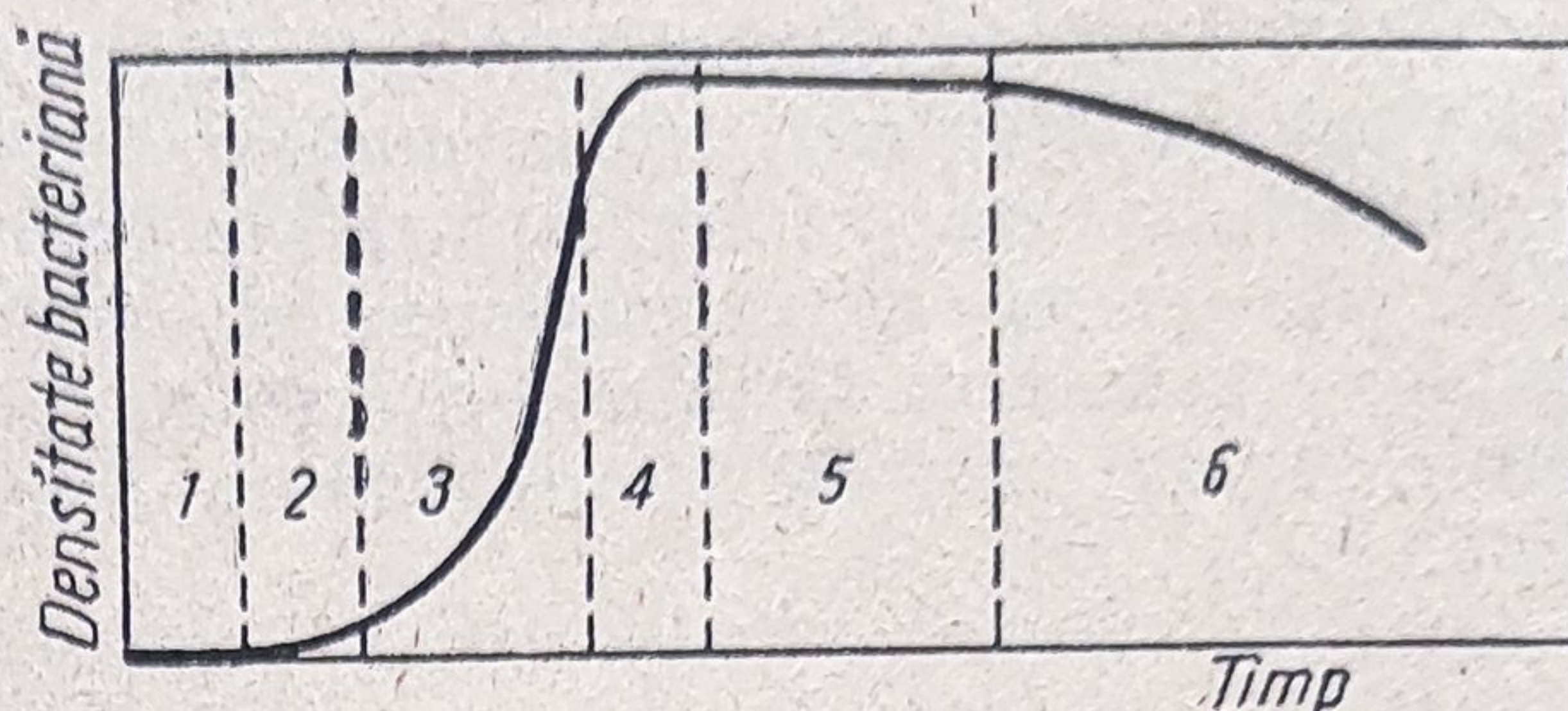


Fig. 3. Curba de creștere numerică a bacteriilor într-un vas închis :

1 — faza de latență ; 2 — faza de accelerare ; 3 — faza logaritmică sau exponențială ; 4 — faza de încetinire ; 5 — faza staționară ; 6 — faza de declin.

1. *faza de latență*, în care nu se înregistrează o creștere a numărului de bacterii. Aceasta este o etapă de adaptare a populației bacteriene la noile condiții de mediu și durează circa 2 h ;

2. *faza de creștere logaritmică*, în care numărul bacteriilor crește în proporție geometrică timp de aproximativ 2 h ;

3. *faza staționară*, după atingerea unui nivel maxim de multiplicare, numărul celulelor vii rămânând neschimbat câteva ore ;

4. *faza de declin*, în care celulele bacteriene îmbătrânesc și viabilitatea lor scade progresiv.

În mod obișnuit, în cursul diviziunilor celulare toți descendenții sînt identici între ei. Pot apărea însă și variații genetice prin trei mecanisme principale : mutație, recombinare cromozomală și transfer de plasmide.

Mutația se produce prin modificări ale secvenței nucleotidelor unei gene care modifică structura și, prin urmare, funcția unei proteine specifice. Aceste modificări pot surveni sub influența unor factori fizici (U.V., radiații ionizante etc.) sau chimici (de exemplu, acidul nitros).

Recombinarea cromozomală duce la apariția unor variante cu genomul modificat, cunoscute sub numele de *recombinanți*. Acești recombinanți sînt rezultatul integrării în propriul genom a unor fragmente de ADN străin. Se cunosc trei mecanisme de pătrundere a ADN străin în bacterie :

— transformarea genomului prin pătrunderea de ADN liber și integrarea sa în cromozomul bacterian ;

— conjugarea, care este o veritabilă acuplare între o bacterie „donator mascul” și o bacterie „receptor femel”, urmată de transfer de ADN cromozomal ;

— transducția fagică, prin care un fragment de cromozom este transferat de la o bacterie la alta prin intermediul unui bacteriofag.

Transferul de plasmide constă din transferul de factori genetici existenți în citoplasmă (plasmide), independenți de cromozom, de la o bacterie la alta, prin conjugare sau prin intermediul unor bacteriofagi. De exemplu, transmiterea plasmidelor purtătoare a caracterului de rezistență la antibiotice (factorul R) de la o bacterie rezistentă la una sensibilă are importante repercusiuni în practica medicală.

Tema 3

STERILIZAREA ȘI DEZINFECȚIA

3.1. STERILIZAREA PRIN CĂLDURĂ ȘI ALTE METODE FIZICE

Sterilizarea este procedeul prin care se obține distrugerea tuturor microorganismelor, saprofite sau patogene, atât sub formă vegetativă, cât și sub formă sporulată.

În practică, sterilizarea se realizează prin **agenți fizici**, mai ales prin *căldură*. Alte metode fizice folosite sînt: *radiațiile*, *filtrarea* și, mai rar, *centrifugarea controlată*.

Căldura folosită pentru sterilizare poate fi uscată sau umedă. Inactivarea bacteriilor se datorează, în primul rînd, coagulării proteinelor.

Sterilizarea prin căldură uscată se obține prin încălzirea la roșu a ansei bacteriologice, flambarea pipetelor, baghetelor, a gîtului flacoanelor și eprubetelor, a spatulei etc. și, mai ales, prin folosirea cuptorului cu aer cald (pupinel). Acest cuptor se utilizează, în primul rînd, pentru sterilizarea sticlăriei de laborator și a unor instrumente chirurgicale metalice. Sterilizarea se obține la 180°C, timp de o oră.

Sterilizarea prin căldură umedă se obține prin pasteurizare, tîndalizare, fierbere, vaporii sub presiune.

— *Pasteurizarea* este o sterilizare parțială, deoarece distruge numai formele vegetative. De altfel, această metodă, folosită în special pentru lapte, constă în ridicarea temperaturii unui lichid la 61—62°C, timp de 30 min, sau 71°C, timp de 30 s, urmată de o răcire bruscă la 4°C. Se obține, astfel, o inactivare a bacteriilor patogene în formă vegetativă (în primul rînd, a brucelelor și a bacilului tuberculos bovin), fără distrugerea vitaminelor și enzimelor sau alterarea proteinelor.

— *Tindalizarea* este o metodă de sterilizare prin încălzire discontinuă. Lichidul supus tindalizării (ser sanguin, soluții de proteine etc., care nu suportă temperaturi ridicate) este încălzit la o temperatură în jur de 60°C , timp de o oră, 3 zile consecutiv. Prima încălzire distruge formele vegetative, cea de a doua sporii care au germinat și a treia eventualii germeni neinactivați în primele două zile.

— *Fierberea* la 100°C , timp de 30 min, este folosită în caz de necesitate pentru sterilizarea seringilor, a tuburilor de cauciuc, a instrumentelor metalice.

— *Sterilizarea cu vapori de apă sub presiune* se realizează, de obicei, cu ajutorul autoclavei. Această metodă este foarte eficientă, deoarece distruge toate bacteriile, indiferent dacă sînt sub formă vegetativă sau sporulată.

Cînd trebuie să sterilizăm produse care nu suportă temperaturi peste punctul de fierbere al apei, atunci robinetul de vapori al autoclavei rămîne deschis și spunem că sterilizăm cu vapori la 100°C .

Radiațiile sînt folosite pentru sterilizare numai în anumite situații.

Radiațiile ultraviolete, care produc ozon în mediile pe care le străbat, sînt utilizate pentru sterilizarea unor spații de lucru (boxe, camere etc.). Eficiența acestor radiații este nulă dacă spațiul și mobilierul respectiv nu sînt menținute într-o stare de curățenie perfectă. În timpul lucrului, dacă lămpile sînt în funcțiune, trebuie protejate tegumentele și ochii cu măști și ochelari de protecție.

Radiațiile ionizante (X și Y) sînt folosite, mai ales, pentru sterilizarea materialelor plastice care sînt deteriorate de temperaturi ridicate. Și aici sînt necesare măsuri de protecție speciale pentru personalul care manipulează aparatura ce generează aceste radiații.

Filtrarea este o metodă de sterilizare fizică ce se bazează pe reținerea microorganismelor dintr-o suspensie cu ajutorul unor filtre a căror porozitate este perfect cunoscută. Cele mai utilizate sînt: *filtrele de azbest* (Seitz), *de sticlă* (Schott) sau *de celuloză* (millipore). Metoda este folosită pentru „debarasarea” de microorganisme a unor lichide organice (ser sanguin, lichid de ascită etc.) sau medii de cultură speciale care nu pot fi sterilizate prin căldură.

3.2. ANTISEPTICELE

Dezinfecția (sau **antisepsia**) este procedeul de distrugere a microorganismelor cu ajutorul substanțelor antiseptice sau dezinfectante. În vorbirea curentă, **dezinfectante** sînt denumite acele substanțe chimice care au o toxicitate mai ridicată și, din acest motiv, se aplică

numai pe substraturi inerte. Spre deosebire de acestea, substanțele antiseptice au o toxicitate relativ redusă, astfel că ele pot fi aplicate și pe leziunile deschise, expuse infectării.

În laboratorul de microbiologie sînt folosite numeroase substanțe dezinfectante. Dintre acestea, menționăm doar cîteva :

- *alcoolul etilic soluție apoasă 70%* (100 ml alcool de 96° + 40 ml apă distilată) inactivează bacteriile prin coagularea proteinelor. El este folosit pentru dezinfecția mîinilor și a unor instrumente ;

- *glicerina* (alcoolul propilic) distruge bacteriile, dar este un bun conservant pentru unele virusuri ;

- *fenolul-soluție apoasă 3—5%* este un bun dezinfectant pentru spută și produse purulente, distrugînd bacteriile prin coagularea proteinei celulare ;

- *formolul 40%* se folosește în diverse concentrații atît sub formă lichidă, cît și sub formă de vapori, pentru distrugerea bacteriilor, ciupercilor microscopice și a virusurilor ;

- *sublimatul* (diclorura de mercur) în soluție apoasă 1—2‰ are o mare putere bactericidă ; în concentrații mari acționează prin coagularea proteinelor, iar în concentrații mici, prin combinarea mercurului cu grupările sulfhidrice ;

- *cloraminele* au acțiune inactivantă asupra celulelor vii, prin oxidarea grupărilor sulfhidrice libere. Ele sînt larg folosite în laboratoarele medicale, începînd cu dezinfecția unor materiale de protecție, a suprafețelor de lucru etc. și continuînd cu inactivarea agenților patogeni din spută, fecale și alte produse patologice ;

- *detergenții* sau *agenții activi de suprafață* au proprietatea de a se concentra în jurul membranei celulare, împiedicînd astfel buna funcționare a acesteia. Prin acțiunea lor emulsionantă, detergenții sînt foarte utili la spălarea și curățirea materialelor de laborator, a suprafețelor de lucru etc.

Tema 4

EXAMENUL MORFOLOGIC AL BACTERIILOR

Creșterea bacteriilor pe mediile de cultură prezintă aspecte macroscopice caracteristice pentru anumite specii.

În mediile lichide, bacteriile se pot dispersa uniform sau pot forma depozite la fundul eprubetei. Bacteriile foarte aerofile formează un vîl la suprafața mediului sau un inel aderent la pereții eprubetei.

Pe mediile solide, bacteriile formează colonii care pot îmbrăca aspecte particulare (mărime, formă, pigmentare, transparență, consistență, aderență la mediu, margine regulată sau crenelată, suprafețe netede sau rugoase etc.) ce ușurează identificarea lor.

Este important de știut că, în general, bacteriile pot fi de formă **S** (*smooth*) și de formă **R** (*rough*). Pe mediile solide, tipul **S** formează colonii netede, lucioase, cu marginile regulate, iar în mediile lichide dau naștere la culturi care tulbură uniform mediile respective. Tipul **R** formează colonii cu suprafața rugoasă și marginile crenelate, iar în mediile lichide culturile sedimentează.

Marea majoritate a bacteriilor patogene (cu unele excepții, ca, de exemplu, *b. tuberculos*, *b. difteriei* sau *b. cărbunos*) sînt de formă **S**. Formele **R** sînt degradate din punct de vedere antigenic și reprezintă variante nevirulente ale speciei respective.

Cu ajutorul microscopului optic bacteriile pot fi studiate atît în stare nativă (proaspete, umede), cît și pe frotiuri uscate, fixate și colorate.

4.1. EXAMINAREA PREPARATELOR NATIVE

Preparatele native se pot face dintr-o cultură microbiană sau direct din produs. Se ia cu ansa sau cu o pipetă Pasteur o picătură din cultura lichidă sau din cultura suspensionată, în soluție salină fiziologică și se depune pe o lamă curată și degresată, peste care se pune o lamelă curată. Apoi se examinează la microscopul optic.

Pe preparatele native sînt evidențiate existența, forma și mobilitatea microorganismelor (care nu trebuie confundată însă cu mișcările browniene).

După examinare, preparatele trebuie puse într-un cristalizor cu amestec sulfocromic, deoarece conțin germeni vii.

Preparatele native pot fi examinate și pe fond întunecat, precum și prin procedeul contrastului de fază.

Examenul microscopic pe fond întunecat se bazează pe fenomenul Tyndall. Luminarea preparatului nativ se face lateral, astfel că bacteriile, reflectînd o parte din razele luminoase, apar clar conturate pe fondul negru al cîmpului microscopic. Procedeul este utilizat, mai ales, pentru germenii care se colorează mai greu (*treponemele*, *leptospirele* etc.). Acești germeni pot fi puși rapid în evidență în serozitatea din șancrul sifilitic, în lichidul cefalorahidian, în sângele citratat sau în urină, examinarea lor fiind făcută pe preparate proaspete între lamă și lamelă.

Examenul prin contrast de fază se bazează pe următorul principiu : dacă două componente celulare transmit o cantitate de lumină egală ele nu pot fi diferențiate cu microscopul obișnuit, dar dacă acestea au un indice de refracție diferit, atunci ele pot fi ușor individualizate cu ajutorul microscopului cu contrast de fază, datorită luminozității lor inegale.

4.2. EXAMINAREA PREPARATELOR COLORATE

Coloranții folosiți în mod curent în bacteriologie sînt substanțe organice colorate, ușor solubile, de cele mai multe ori sintetice, avînd proprietatea de a colora diferite substraturi chimice. Colorația se realizează prin *combinație chimică*, *absorbție* sau *dizolvare* în structura pe care o pune în evidență.

Pentru a fi colorate, bacteriile sînt, în prealabil, supuse unor operații pregătitoare.

Prepararea frotiului. Frotiul se prepară prin etalarea produsului de examinat pe o lamă curată și perfect degresată, astfel încît germenii să formeze un strat subțire, uniform. Etalarea culturii sau a produsului se realizează cu ajutorul unei anse de platină sau a unei pipete Pasteur. Se ia o picătură din cultura lichidă și se întinde circular pe lamă. Cînd cultura este pe mediu solid, se raclează o porțiune din cultură cu ansa sterilizată și răcită și se depune pe o lamă de sticlă pe care, în prealabil, s-a pus o picătură de soluție salină fiziologică, după care se omogenizează și se răspîndește uniform pe lamă.

Frotiul astfel confecționat este lăsat să se usuce la temperatura camerei.

Fixarea frotiului. După uscarea frotiul este supus operației de fixare prin căldură sau prin lichide fixatoare, cum sînt : alcoolul metilic, alcoolul etilic, alcoolul-eter etc. Pentru fixare prin căldură, se trece lama de 2—3 ori, cu fața opusă frotiului, prin flacăra unui bec de gaz. Încălzirea se face la 60—70°C (lama este suportată de dosul mîinii). Prin fixare bacteriile sînt omorîte, evitîndu-se astfel pericolul infectării. În plus, se mărește aderența preparatului de lamă, iar afinitatea sa pentru colorant crește. O fixare corectă nu trebuie să producă modificări ale formei și structurii microorganismului supus acestei operații.

Colorațiile pot fi *simple, diferențiale și speciale*.

Colorațiile simple

— *Colorația cu albastru de metilen*. Frotiul uscat și apoi fixat la flacără este acoperit cu soluție de albastru de metilen timp de 1—2 min. Se spală după aceea frotiul cu apă de robinet, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Prin această metodă, toate elementele din câmpul microscopic apar colorate în albastru. Este o colorație rapidă, care pune în evidență forma, gruparea și, eventual, raporturile germenilor cu leucocitele sau cu alte elemente prezente în frotiu.

— *Colorația cu fucsină fenicată Ziehl diluată 1/10* se efectuează în același mod ca și cea cu albastru de metilen. Elementele din frotiu apar colorate în roșu.

Colorațiile diferențiale

— *Colorația Gram* este o metodă foarte mult utilizată în bacteriologie, deoarece împarte bacteriile în două mari categorii: bacterii Gram-pozitive și bacterii Gram-negative.

Tehnica colorației este următoarea: frotiul uscat este fixat prin căldură; se acoperă lama cu soluție apoasă de violet de gențiană și se lasă timp de 1—2 min; se varsă colorantul și se acoperă lama cu soluție Lúgol timp de 2 min; se varsă mordantul (sol. Lúgol) și se tratează frotiul cu alcool-acetonă timp de câteva secunde; se spală rapid lama cu apă de robinet și se acoperă cu fucsină diluată 1/10 în apă, timp de 30 s pînă la 1 min; se varsă fucsina și se spală frotiul cu apă de robinet; după uscare se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Bacteriile Gram-pozitive rezistă la decolorare, rămînînd colorate în violet, iar cele Gram-negative sînt decolorate de alcool-acetonă și recolorate în roșu.

— *Colorația Ziehl Neelsen*. Prin această colorație se pun în evidență b. tuberculozei și b. leprei.

Tehnica folosită pentru colorație este următoarea: frotiul uscat se fixează la flacără; se acoperă lama cu fucsină fenicată Ziehl și timp de 10 min se încălzește intermitent, cu ajutorul unei lămpi de alcool sau la flacăra unui bec Bunsen pînă la emiterea de vapori; se varsă colorantul, se spală frotiul cu apă de robinet și se decolorează cu acid azotic diluat 1/3, sau cu acid sulfuric diluat 1/4; se varsă acidul și se spală lama cu apă de robinet, după care se decolorează frotiul cu alcool de 96°; se varsă alcoolul și se spală frotiul din nou cu apă de robinet, după care se recolorează cu o soluție apoasă de albastru de metilen 1%, timp de 1 min; se spală frotiul cu apă de robinet, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

B. tuberculozei și b. leprei, care rezistă la decolorarea cu acid și alcool, sînt colorați în roșu, în timp ce toate celelalte elemente de pe frotiu sînt colorate în albastru.

Colorațiile speciale

Colorații pentru punerea în evidență a capsulei bacteriene.

Metoda Burri. Pe o lamă perfect curată se pune o picătură din suspensia de bacterii capsulate și o picătură de tuș de China. După ce se omogenizează, se face un frotiu prin etalarea amestecului cu o altă lamă. Se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie. Pe fondul negru al preparatului, bacteriile împreună cu capsulele lor apar incolore.

Colorația Loeffler cu albastru de metilen se efectuează cu o soluție învechită de albastru de metilen Loeffler. Prin această colorație corpul bacterian se colorează în albastru, iar capsula în roz.

Colorație pentru cili bacterieni.

Cili nu pot fi văzuți la microscopul fonic pe preparatele native sau pe frotiurile cu colorație obișnuită. Pentru a fi puși în evidență, se folosesc metode speciale de colorație.

Metoda Zettnow. Colorația după această metodă se desfășoară astfel: se prepară o suspensie diluată de germeni în apă distilată, din care se iau 2—3 picături cu o pipetă Pasteur și se depun pe o lamelă degresată și flambată; se lasă frotiul să se usuce, după care se fixează cu formol diluat 1/10, timp de 10 min; se pune lamela în apă distilată timp de 3 min, după care se introduce într-o soluție de tanin și de tartrat de stibiu și potasiu încălzită la 60—70°C, timp de 10 min; se scoate lamela cu o pensă și se clătește bine în apă de robinet; se acoperă frotiul cu o soluție de sulfat de argint și amoniac, care se prepară în momentul folosirii și se încălzește ușor la flacără, timp de 30—60 s; se spală frotiul cu apă distilată, se usucă și se montează în ulei de cedru, prin aplicarea lamelei cu frotiul în jos pe o lamă foarte curată, după care poate fi examinată la microscop.

Colorație pentru punerea în evidență a sporilor.

Metoda Gray modificată. Se fac frotiuri care se lasă să se usuce și se fixează prin căldură; se acoperă lama cu o soluție apoasă de verde malahit 5% și se încălzește de trei ori până apar vapori. După fiecare încălzire se îndepărtează colorantul și se înlocuiește cu altul proaspăt; se spală apoi frotiul cu apă și se acoperă cu o soluție de fucsină diluată 1/10, timp de 1—2 min; se varsă colorantul, se spală lama cu apă, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Sporii apar colorați în verde-albăstrui, iar corpul bacterian apare colorat în violaceu.

Colorație pentru punerea în evidență a treponemelor și leptospirelor.

Impregnația argentică (metoda Fontana-Tribondeau). Tehnica este următoarea: frotiul uscat nu se fixează la flacără; pentru fixare și dezhemoglobinizare se acoperă frotiul cu soluție Rügge, care trebuie schimbată de trei ori în decurs de 1 min; se spală lama cu apă distilată și se acoperă apoi, 3 min, cu o soluție de acid tanic 5%, care se încălzește până la emisie de vapori; se spală cu apă distilată și se colorează frotiul cu o soluție amoniacală de nitrat de argint, timp de 10 min, încălzită până la emisie de vapori; se spală cu apă distilată, se lasă să se usuce și se examinează la microscop cu obiectivul cu imersie.

Treponemele și leptospirele apar colorate în negru-brun, iar restul frotiului în galben.

Colorarea preparatelor de sînge pentru punerea în evidență a unor microorganisme ca: spirochete, hematozoarul palustru, toxoplasma.

Colorația May-Grünwald-Giemsa. Frotiul obținut prin etalarea pe lamă în strat subțire a unei picături proaspete de sînge este fixat prin acoperirea cu o soluție May-Grünwald, timp de 4 min, sau cu alcool metilic pur, timp de 10 min. După fixare, peste soluția May-Grünwald se adaugă o cantitate egală de apă distilată neutră și se lasă 1 min. Se varsă soluția May-Grünwald și se acoperă lama cu soluție Giemsa diluată (3 picături soluție Giemsa la 2 ml apă distilată neutră). După 20 min se varsă colorantul, se spală lama cu apă distilată, se lasă să se usuce și se examinează la microscop. Pe aceste preparate spirochetele sînt colorate în violet, hematozoarul se colorează în albastru-violet etc.

Tema 5

PATOGENITATEA BACTERIILOR

Patogenitatea — capacitatea microorganismelor de a provoca un proces infecțios — este strâns legată de parazitismul acestora, de mijloacele de agresiune pe care le posedă, de capacitatea de apărare antiinfecțioasă a organismului atacat. Când rezistența acestuia din urmă scade, chiar și unele bacterii considerate saprofite pot deveni agresive, patogene.

5.1. VIRULENȚĂ. TOXIGENEZĂ

Principalele caractere de patogenitate ale bacteriilor sînt: virulența și toxigeneza.

Virulența este capacitatea unui microorganism patogen de a pătrunde în organism și de a se multiplica în țesuturile și umorile acestuia. Această invazie produce perturbări în funcționarea normală a organismului. Virulența poate varia foarte mult de la o specie bacteriană la alta, iar în cadrul aceleiași specii de la o tulpină la alta. Mai mult, la aceeași tulpină bacteriană virulența poate crește prin treceri repetate de la o gazdă la alta, sau poate diminua prin menținerea îndelungată pe medii de cultură artificiale.

Acest atribut al patogenității unei bacterii poate fi măsurat în laborator prin inocularea sa într-un anumit număr și pe anumite căi (subcutan, intraperitoneal, intracerebral etc.) la animale susceptibile. În continuare, se urmărește mortalitatea și se determină DCL (*doza certă letală*), care reprezintă numărul minim de microorganisme ce produce moartea sigură a unui animal sau, mai corect, DL_{50} (*doza letală 50%*), care reprezintă numărul de germeni (calculat statistic) ce produce moartea a 50% din animale. Este de la sine înțeles că o tulpină este cu atît mai virulentă, cu cît DCL sau DL_{50} este mai mică.

În general tulpinile bacteriene capsulate sînt mai virulente, deoarece sînt mai rezistente la fagocitoză.

Toxigeneza este proprietatea anumitor germeni patogeni de a produce anumite substanțe toxice pentru organism. Acestea sînt de trei feluri: exotoxine, endotoxine și metaboliți toxici.

Doza letală minimă (DLM) a unei toxine este cantitatea minimă capabilă să omoare un animal sensibil, într-un anumit interval de timp.

Exotoxinele sînt substanțe proteice secretate de unele bacterii, cum sînt : b. tetanic, b. difteric, b. botulinic, b. dizenteric etc. Ele au cîteva proprietăți comune :

- sînt de natură proteică, fiind distruse prin încălzire ;
- sînt foarte antigenice ; introduse în organism produc titruri înalte de anticorpi, antitoxine (antitetanică, antidifterică etc.) ;
- acționează în cantități foarte mici, fiind foarte toxice ; produc leziuni specifice (pe sistemul nervos, cord, glandele suprarenale etc.) ;
- prin încălzire la temperaturi moderate sau prin tratarea cu formol, în anumite concentrații, exotoxinele își pierd toxicitatea, dar își păstrează capacitatea antigenică, adică proprietatea de a induce antitoxine. Prin aceste procedee se prepară vaccinurile antitoxice (tetanic, difteric), care mai sînt cunoscute și sub numele de **anatoxine** sau **toxozii**.

Toxinele pot fi titrate atît „in vitro“ (de exemplu, reacția de floculare), cît și „in vivo“ (reacția de neutralizare toxină-antitoxină).

Endotoxinele sînt substanțe complexe (fosfo-lipo-polizaharide), care compun peretele celular al bacteriilor Gram-negative (salmonelle, b. dizenteric, b. coli etc.) și care nu pot fi puse în libertate decît prin dezagregarea germenului respectiv. Datorită compoziției lor chimice, endotoxinele sînt destul de rezistente la căldură. Ele sînt mai slab antigenice decît exotoxinele, iar activitatea lor patogenă este lipsită în mare măsură de specificitate ; în anumite concentrații, toate endotoxinele produc febră, stare de șoc, necroză locală.

Metaboliții toxici sînt enzime extracelulare pe care germenii patogeni le eliberează în țesuturile infectate. Dintre acestea, menționăm cîteva mai importante și modul lor de acțiune : *hemolizina* produce dezintegrarea hematiilor ; *leucocidina* distruge leucocitele și diminuează fagocitoza ; *hialuronidaza* produce hidroliza acidului hialuronic — component de bază al cimentului intercelular — și, prin aceasta, favorizează diseminarea infecției ; *coagulaza* produce coagularea plasmei, care are drept consecință împiedicarea pătrunderii fagocitelor în focarul de infecție ; *fibrinolizina* lizează fibrina din cheaguri și favorizează răspîndirea agentului patogen în organism ; *lecitinaza* produce hidroliza lecitinei din țesuturi.

5.2. INFECȚIE. INFLAMAȚIE

Infecția este procesul prin care un microb patogen pătrunde, se adaptează și se multiplică într-un organism.

În funcție de principalele căi de pătrundere a microbului în organism, bolile infecțioase se grupează în :

— *boli aerogene*, în care microbul este inhalat o dată cu aerul contaminat, iar pătrunderea sa în organism se face prin mucoasa aparatului respirator (de exemplu, tuberculoza pulmonară, difteria, scarlatina etc.) ;

— *boli digestive*, contractate prin ingestia de apă sau alimente contaminate (de exemplu, febra tifoidă, dizenteria bacilară, bruce-loza etc.) ;

— *boli cu poarta de intrare cutanată sau prin mucoase* ; agenții patogeni pătrund în organism în urma unei înțepături (tetanosul), mușcături (rabia), prin leziuni neînsemnate ale tegumentelor sau mucoaselor (stafilocociile, streptocociile etc.), sau chiar prin tegu-mentele intacte (leptospirozele, tularemia etc.).

Infecția bacteriană poate evolua aparent sau inaparent.

În *infecția inaparentă* modificările patologice sînt minore, astfel că boala evoluează fără semne clinice. În aceste cazuri, deși microbul a pătruns în organism, el a fost neutralizat de sistemul imunitar, prin creșterea specifică a rezistenței față de o nouă infectare și prin modificări serologice (creșterea titrului anticorpilor specifici) sau apariția unor stări de sensibilizare alergică de tip imediat sau întîr-ziat, ce pot fi puse în evidență prin testări adecvate (reacții de tip antigen-anticorp, i.d.r., teste de sensibilizare celulară „in vitro” etc.).

Infecția aparentă se manifestă prin semne *nespecifice*, obiective (febră, frisoane etc.) sau subiective (cefalee, dureri articulare etc.), sau prin semne *specifice* (contracturi musculare în tetanos, false membrane în regiunea faringo-amigdaliană în difterie, tuse spastică repetată în tusea convulsivă etc.), la care se adaugă semnele imu-nologice specifice puse în evidență prin teste de laborator.

Evoluția unei boli infecțioase se desfășoară în mai multe etape a căror durată este specifică : *incubația* — timpul scurs de la con-taminare pînă la apariția primelor semne de boală (debutul bolii) ; *perioada de stare*, în care se manifestă semnele clinice caracteristice bolii și care se poate termina nefavorabil pentru organism prin deces sau, dimpotrivă, bolnavul intră într-o *perioadă de refacere* — con-valescența, după care urmează *vindecarea* completă sau cu defi-ciențe, uneori pentru tot restul vieții (sechele după poliomielită, me-ningită etc.).

Ca urmare a stării de infecție apar modificări ale imunității (vaccinare, sensibilizare etc.). În unele cazuri, vindecarea clinică nu este însoțită și de dispariția microbului care a produs-o ; fostul bol-nav poate deveni om sănătos, dar și un purtător de germeni per-manent sau numai pentru o perioadă de timp.

Inflamația este răspunsul organismului la agresiunea microbului patogen. Acest răspuns inflamator începe prin dilatarea arteriolelor

și a vaselor capilare locale, care permit astfel ieșirea plasmei și acumularea acesteia în lichidul de edem. Leucocitele polimorfonucleare ies din vasele capilare și, stimulate de unele substanțe chimice din exsudatul inflamator, migrează către acest focar, unde încep să fagociteze bacteriile. În continuare, pH-ul local scade, iar polimorfonuclearele încep să fie lizate. În focar se acumulează macrofage care înglobează atât resturile de leucocite, cât și de germeni și, în cazul unei evoluții favorabile, procesul inflamator local începe să meargă spre vindecare. Semnele clinice locale ale inflamației sînt: *edem, roșeață, căldură și durere locală*.

Tema 6

MIJLOACE DE APĂRARE A ORGANISMULUI CONTRA INFECȚIEI

În fața unei agresiuni bacteriene, organismul posedă *mijloace de apărare specifice și nespecifice*.

6.1. MIJLOACE DE APĂRARE NESPECIFICE

Acestea sînt constituite din „bariere mecanice” și fiziologice, fagocitoză, constituenți biochimici ai unor țesuturi și, uneori, reacție inflamatorie, febră și altele.

Barierile mecanice și fiziologice la poarta de intrare sînt reprezentate de piele și mucoase.

Pielea intactă este rar traversată de bacterii, iar secreția seboreică are o acțiune bactericidă, mai ales față de germenii patogeni.

Mucoasele sînt acoperite de o peliculă de mucus protectoare. La acestea se adaugă unii factori locali, cum sînt: epiteliul ciliat al căilor respiratorii, care elimină în permanență, în mod mecanic, bacteriile pătrunse în arborele respirator; pH-ul puternic acid al sucului gastric și acțiunea proteolitică a enzimelor intestinale care distrug într-o mare măsură microorganismele din alimente, flora normală a cavității vaginale, care întreține un pH acid impropriu dezvoltării germenilor patogeni etc.

Fagocitoza este activitatea de ingerare și digerare a bacteriilor, proprie unui anumit tip de celule numite *fagocite*: polimorfonuclearele neutrofile, macrofagele libere și cele fixe din sistemul reticuloendotelial.

Constituenții biochimici ai unor țesuturi au, de asemenea, o activitate bactericidă.

Reacția inflamatorie, descrisă în tema anterioară, reprezintă un proces activ, într-o mare măsură nespecific, de limitare și lichidare a infecției.

Febra, unul din semnele obișnuite ale oricărei boli infecțioase, s-a dovedit a avea un anumit rol în mobilizarea mijloacelor de apărare antimicrobiană a organismului.

6.2. MIJLOACE DE APĂRARE SPECIFICE (IMUNITATEA)

În lupta pe care organismul o duce împotriva infecției sînt mobilizate numeroase mijloace de apărare specifică, cunoscute sub numele generic de **imunitate**.

Imunitatea poate fi *naturală* sau *dobîndită*.

Imunitatea naturală reprezintă acea rezistență a organismului care nu a fost dobîndită printr-un contact anterior cu agentul infecțios. Aceasta poate îmbrăca mai multe aspecte.

Imunitatea de specie are la bază mecanisme genetice insuficient cunoscute. Ea este un tip de imunitate naturală proprie anumitor specii animale. Omul este rezistent, de exemplu, la agentul etiologic al tuberculozei aviare, în timp ce toate animalele sînt rezistente la gonococ, bacilul tific, *Treponema pallidum* etc.

În cadrul aceleiași specii, unele rase sînt sensibile la un anumit agent patogen, în timp ce altele sînt rezistente. De asemenea, rezistența naturală poate varia foarte mult de la un individ la altul, în funcție de vîrstă și alimentație, de existența unor boli debilizante sau a unui dezechilibru hormonal etc.

Imunitatea dobîndită poate fi obținută de un individ în cursul vieții sale, fie *activ* (prin infecție sau prin vaccinare), fie *pasiv* (de la mamă în stadiul embrionar sau prin injectare de ser imun).

Trebuie cunoscut că dacă anumite **antigene** pătrund într-un organism în mod accidental (infecție) sau în mod deliberat (vaccinare), ele provoacă formarea de **anticorpi**. Anticorpii specifici se unesc numai cu antigenele care au determinat formarea lor.

În categoria antigenelor intră și numeroasele microorganisme, inclusiv cele patogene, precum și toxinele elaborate de acestea. În aceste situații anticorpii formați blochează agenții patogeni și neutralizează toxinele produse de aceștia.

Din punct de vedere chimic, anticorpii sînt globuline cu o greutate moleculară între 150 000 și 900 000. În funcție de tipul de reacție antigen-anticorp pe care îl realizează, anticorpii sînt denumiți *aglutinine*, *precipitine*, *opsonine*, *antitoxine*, *anticorpi fixatori de complement*, *lizine* etc.

După viteza de migrare într-un câmp electric (electroforeză), imunoglobulinele (*Ig*) pot fi separate în mai multe clase :

— *IgG* sînt egal distribuite în sînge și fluidele extravasculare ; au rol important în neutralizarea antigenelor solubile cum sînt, de exemplu, toxinele bacteriene.

— *IgM*, localizate mai ales intravascular, acționează asupra antigenelor particulate, contribuind astfel la imunoliza celulară.

— *IgA* se pot găsi sub două forme diferite din punct de vedere al constituției chimice : *IgA din ser*, cu activitate antibacteriană și antitoxică și *IgA din secreții* (salivă, lacrimi, colostru, secreții nazale, bronșice, intestinale), cu rol important în crearea unei bariere imune antiinfecțioase la nivelul mucoaselor.

— *IgE* se găsesc, în special, în serul indivizilor alergici.

— *IgD* au fost depistate în cantitate redusă, iar rolul lor biologic nu a fost încă precizat.

Formarea anticorpilor este condiționată de întîlnirea antigenelor cu sistemul celular imunocompetent (macrofage, limfocite și plasmocite).

Macrofagul captează și „prelucrează” antigenul, inițiind o serie de modificări celulare, care ulterior au ca rezultat formarea de anticorpi umorali și celulari. În formațiunile limfoide periferice, în ganglionii regionali, în splină sau în alte formații limfoide centrale în care s-a oprit macrofagul încep să apară „centrii germinativi”. Aceștia sînt formați din macrofagele care au înglobat antigenul, înconjurat de limfocite.

Limfocitele preiau de la macrofag informația asupra noului antigen pătruns în organism, după care încep să se diferențieze și să prolifereze. În această fază celulele imunocompetente devin celule imunoformatoare.

Unele limfocite se diferențiază în *plasmocite*, care produc imunoglobuline și limfocite B „cu memorie”, ce inițiază răspunsul secundar la o nouă pătrundere a antigenului în organism.

Serurile imune conțin imunoglobuline și ele pot fi utilizate fie în scop terapeutic (ser antidifteric, ser antitetanic etc.) pentru obți-

nerea rapidă a unei imunizări pasive, cu anticorpi specifici gata formați, fie în scop diagnostic (seruri aglutinante anti-salmonelle, anti-shigella etc.) pentru identificarea unor agenți patogeni.

Vaccinurile sînt produse biologice (bacterii omorîte sau cu virulență atenuată, anatoxine etc.) utilizate în profilaxia unor boli (febră tifoidă, tuberculoză, difterie, tetanos etc.) sau, mai rar, pentru tratament (stafilococii, blenoragie etc.).

Vaccinarea este o metodă de imunizare activă, deoarece organismul își fabrică singur anticorpii. Starea de imunitate se instalează după un anumit interval de timp, dar are o durată mult mai mare față de imunitatea dobîndită pasiv.

Tema 7

FLORA MICROBIANĂ NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN

Organismul uman este într-un contact permanent cu microorganismele din mediul înconjurător. Astfel, tegumentele, mucoasele, cavitățile naturale ale omului sînt populate, începînd de la naștere, cu numeroase specii microbiene care formează așa-numita **microfloră normală**. Pe fiecare zonă a tegumentelor și a mucoaselor se constituie asociații de germeni — microbiocenoze — ce se adaptează condițiilor locale și care se caracterizează printr-o anumită stabilitate.

În funcție de stabilitate, flora microbiană normală poate fi împărțită în două categorii: **floră rezidentă** (stabilă), bine adaptată, foarte puțin influențată de acțiunea mecanică a spălatului și de antisepticele slabe, deoarece este situată mai în profunzime (în porii foliculilor piloși ai glandelor sebacee și sudoripare) și **floră flotantă** (temporară), mai puțin adaptată, care este ușor îndepărtată prin spălare și distrusă de substanțele antiseptice. Acești germeni pot deveni patogeni dacă găsesc condiții favorabile de pătrundere în organism, de dezvoltare și de multiplicare. Același lucru se întîmplă, în special, atunci cînd flora microbiană rezidentă este perturbată.

Flora microbiană normală a omului și animalelor manifestă și unele relații de simbioză cu macroorganismul-gazdă. Astfel, este cunoscut de multă vreme faptul că unele specii, aparținînd florei intestinale, contribuie la menținerea stării de sănătate a omului și animalelor. Ele sintetizează unele vitamine (K, acidul folic, acidul nicotinic, tiamina, riboflavina, piridoxina, acidul pantotenic, biotina),

care sînt necesare metabolismului organismului. Flora microbiană normală are acțiune antagonică față de unii germeni patogeni, împiedicînd, de exemplu, implantarea acestora în intestin. Microflora intestinală determină o creștere a rezistenței față de unele boli infecțioase, prin stimularea unor mecanisme de apărare nespecifice.

Prezența florei microbiene normale are un rol important în funcționarea normală a organismului.

7.1. FLORA NORMALĂ A PIELII

Deoarece pielea vine în contact direct și permanent cu mediul exterior, ea este cea mai expusă la contaminare cu diferite microorganisme. Există, totuși, și aici o *floră rezidentă* formată din : stafilococi nepatogeni, streptococi viridans și nehemolitici, specii variate de lactobacili, bacili difterimorfi etc.

Flora flotantă cuprinde : stafilococi aurii, *B. coli*, *B. proteus*, *Klebsiella*, b. piocianic, micobacterii nepatogene etc. Printre factorii care joacă un rol important în eliminarea germenilor nerezidenți ai pielii sînt pH-ul, acizii grași ai glandelor sebacee, prezența lizozimului.

7.2. FLORA NORMALĂ A CĂILOR RESPIRATORII SUPERIOARE

În nas, faringe, și mai puțin în trahee, se întîlnesc ca germeni *rezidenți* : streptococi viridans, bacili difterimorfi, stafilococi albi nepatogeni, pneumococi necapsulați, diferite specii din genul *Haemophilus*, neisserii saprofite și, ocazional, lactobacili.

Dintre germenii *flotanți* întîlniți în aceste regiuni, menționăm : streptococul hemolitic, pneumococii capsulați, stafilococii patogeni, *Klebsiella*.

Bronhiile și, mai ales, plămîniile sînt zone sterile la omul sănătos. Germenii care pătrund accidental sînt rapid eliminați.

7.3. FLORA NORMALĂ A TUBULUI DIGESTIV

În gură, flora *rezidentă* este reprezentată, în primul rînd, de : streptococi viridans, s. anaerobi, lactobacili, spirochete nepatogene și ciuperci microscopice, iar ca germeni *flotanți*, *B. coli*, *B. proteus*, stafilococi (aerobi și anaerobi), ciuperci microscopice etc.

Stomacul, duodenul și partea superioară a jejunului conțin un număr redus de germeni. Bacteriile pătrund o dată cu alimentele, dar sînt distruse în cea mai mare parte de aciditatea sucului gastric și de enzimele digestive.

În partea inferioară a intestinului subțire și, mai ales, în colon se întâlnește o bogată floră microbială rezidentă și flotantă : 10—20% din conținutul materiilor fecale este constituit din bacterii. Peste 95% din germenii existenți în flora rezidentă din colonul omului adult sănătos sînt anaerobi.

Flora microbială rezidentă poate fi grupată în două categorii : flora de fermentație (lactobacili, streptococi fecali, *b. coli*) și flora de putrefacție (*B. proteus*, bacili Gram-negativi anaerobi, *Clostridium perfringens*, *b. piocianic*, *B. subtilis*). Ca germeni flotanti se pot întâlni : germeni din familia *Enterobacteriaceae* (*b. coli* patogen, *Salmonella*, *B. proteus* etc.), stafilococi aurii, ciuperci microscopice etc.

7.4. FLORA NORMALĂ A VAGINULUI

Flora rezidentă a vaginului este reprezentată de lactobacilul acidofil (*B. döderlein*) și streptococi viridans. Flora flotantă este variată : streptococi și stafilococi nehemolitici și hemolitici (aerobi și anaerobi), *b. difterimorfi*, spirochete, micobacterii, bacili Gram-negativi (aerobi și anaerobi), ciuperci microscopice etc.

Trebuie menționat că flora microbială a mucoasei vaginale variază în funcție de vîrstă, de condițiile fiziologice (sarcină, ciclu menstrual, menopauză) și de igiena personală. De asemenea, pH-ul local acid împiedică stabilirea unor microorganisme patogene. Cînd lactobaciliile Döderlein, care produc acid prin descompunerea glicogenului, sînt distruși cu antibiotice sau antiseptice, se dezvoltă ciupercile și alte bacterii flotante, producînd inflamații.

7.5. FLORA NORMALĂ A URETREI

Aparatul urinar este steril la oamenii sănătoși. Totuși, pe mucoasa uretrei anterioare pot fi întâlnite unele specii microbiene flotante, cum sînt : stafilococi (aerobi și anaerobi), bacili difterimorfi, diplococi Gram-negativi, micobacterii, bacili Gram-negativi (aerobi și anaerobi) etc.

7.6. FLORA NORMALĂ A OCHIULUI

Germenii care pot fi întâlniți pe mucoasa conjunctivală sînt : bacili difterimorfi, neisserii saprofite mici, bacili Gram-negativi, stafilococi și streptococi nehemolitici.

Temă 8

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SECREȚIILOR PURULENTE

Puroiul este reprezentat de un exsudat bogat în leucocite, în mare parte alterate, o cantitate mai mare sau mai mică de fibrină și germeni patogeni.

Aspectul puroiului diferă în funcție de natura microbului care a provocat fenomenul și care imprimă diferite caracteristici exterioare, ce vor constitui informații prețioase pentru diagnostic.

De cele mai multe ori puroiul este rezultatul unei prezențe microbiene — *supurație septică*. Sînt, totuși, situații în care puroiul este consecința unei iritații provocate de diferite substanțe chimice iritante prin constantele lor — *supurație aseptică*.

Pentru a putea determina natura etiologică a procesului supurativ, sînt necesare : izolarea și identificarea germenilor.

Puroiul poate fi recoltat dintr-o *colecție închisă* : pustulă, furuncul, abces, flegmon sau dintr-o leziune deschisă. În primul caz, recoltarea se va face după o riguroasă aseptizare a locului cu iod. Dacă leziunea este foarte superficială (cazul pustulei sau al furunculului) se recoltează cu o pipetă Pasteur. Cînd este mai profundă (cazul abcesului), recoltarea se va face cu o seringă prevăzută cu un ac lung și gros, iar cînd este inabordabilă pe această cale, recoltarea are loc în urma unei incizii făcute într-un serviciu de chirurgie.

Atunci cînd este vorba de o *colecție exteriorizată* sau de o *plagă deschisă*, recoltarea se face cu pipeta Pasteur, cu ansa sau cu tamponul.

Ideal este ca recoltarea să fie practică înainte de instituirea tratamentului.

Caracterele macroscopice ale puroiului recoltat sînt de mare folos, întrucît permit orientarea către un anumit germen și, deci, activitatea ulterioară va fi simplificată, astfel :

- stafilococul face un puroi cremos, bine legat ;
- streptococul, un puroi serofibrinos, clar, nelegat ;
- meningococul, unul clar sau puțin tulbure, foarte fibrinos ;
- pneumococul, un puroi bine legat, cu reflexe verzui ;
- piocianicul, un puroi de culoare albastră ;
- bacilul Koch, un puroi nelegat și puțin fibrinos ;
- germenii anaerobi fac un puroi seros, tulbure, degajînd miros putrid.

În continuarea examenului, pe lame curate și bine degresate, se vor face frotiuri care vor fi colorate Gram, Ziehl-Neelsen și cu al-

bastru de metilen. Examinarea imediată a acestora este obligatorie, întrucât informațiile furnizate sînt elemente de valoare deosebită pe drumul complicat al diagnosticului, și anume :

- permit alegerea celor mai potrivite medii ce trebuie folosite la însămînțările ce se vor face ;
- permit interpretarea corectă a unor situații ulterioare ;
- în unele situații conduc direct la diagnostic.

Chiar dacă examenul microscopic nu pune în evidență germeni, produsul va fi, totuși, însămînțat pe o gamă largă de medii aerobe și anaerobe.

Mediile, după termostatare, vor fi examinate după 24 h, iar în cazuri negative și la 48 h.

Din datele obținute la examenul microscopic direct și al culturilor microbiene pot rezulta o serie de posibilități :

— *în frotiul direct nu au fost puși în evidență germeni*, iar culturile au rămas negative. Puroiul este, în această situație, un produs aseptice ;

— *în frotiul direct germenii au fost absenți, iar culturile pun în evidență o specie microbială*. În această situație sau produsul a fost sărac în germeni și în cantitatea mică de puroi nu a fost prins nici un germen, sau produsul este realmente amicrobian și culturile sînt pozitive datorită unor deficiențe la recoltare sau însămînțare. De fapt, pentru această ultimă situație pledează puternic evidențierea mai multor specii microbiene ;

— *în frotiul direct au fost germeni, iar culturile au rămas negative*. În acest caz sau germenii erau morți în urma terapiei administrate bolnavului înaintea recoltării produsului, sau condițiile de însămînțare și termostatare nu au fost cele favorabile germenului. Se știe că un exsudat care conține *Brucella abortus* trebuie incubat în atmosferă de CO_2 10%, că meningococul reclamă medii îmbogățite și încălzite înainte de a fi însămînțate. De foarte multe ori s-a constatat că mediile însămînțate nu conțineau ingredientele indicate în formulă, că pH-ul nu era cel necesar ;

— *în frotiul direct s-a evidențiat o singură specie microbială, iar în culturi mai multe*. Este situația care evidențiază deficiențe tehnice.

8.1. STAFILOCOCUL

Stafilococul este germenul care, fiind foarte răspîndit în natură, se întîlnește destul de frecvent în procesele supurative. Trebuie, deci, ca recoltarea să se facă corect, după aseptizarea locului, pentru a nu antrena stafilococii aflați la acest nivel.

Frotiul făcut din produsul recoltat dintr-o colecție închisă va arăta coci Gram-pozitivi dispuși în perechi, lanțuri scurte sau izolați. Dacă bolnavul a fost tratat, totuși, cu antibiotice sau chimioterapice, atunci cocii pot prezenta modificări tinctoriale, putînd deveni chiar Gram-negativi. În această situație, cînd în produs este vorba numai de stafilococ, produsul va fi *însămîntat pe bulion și geloză*, cunoscut fiind faptul că stafilococul crește bine pe mediile obișnuite. În mediu cu bulion, stafilococul se va dezvolta tulburînd uniform bulionul, realizînd un sediment redus.

Pe geloză coloniile sînt rotunde, cu diametrul de 1—2 mm, bombate, opace, cu marginile regulate ce se detașează ușor de pe mediu. Incolore la început, se colorează apoi prin dezvoltarea unui pigment în trei variante : stafilococ *albus*, *citreus* și *aureus*.

Stafilococul este un germene aerob, ce se dezvoltă bine la 37°C și la un pH de 7,4 și care fermentează glucoza, lactoza și manița, fermentarea acestui ultim glucid constituind un test de identificare a tulpinilor patogene. Manifestă rezistență la concentrații de 75‰ clorură de sodiu.

Cînd **recoltarea produsului** s-a făcut dintr-o leziune sau o colecție care s-a deschis, atunci situația va fi deosebită. Pe frotiul făcut se vor evidenția și germeni de asociație, de care va trebui să ne debarșăm.

Pentru aceasta, ținînd cont de proprietatea de a crește pe medii hiperclorurate, produsul se va descărca într-o eprubetă cu 10 ml apă distilată sterilă, care după agitare va fi însămîntată într-o eprubetă cu 10 ml mediu lichid hiperclorurat ce conține 150 g sare la ‰. Eprubeta astfel însămîntată va fi termostată timp de 36 h. În acest bulion, datorită concentrației de sare, nu vor crește decît stafilococii. Pentru izolarea celor patogeni se vor face treceri pe mediul hiperclorurat solid. Acest mediu, pe lîngă cantitatea de sare arătată mai sus, mai conține și maniță și roșu fenol ca indicator. Plăcile însămîntate se termostatează 24 h. Examinăte după acest timp, se pun în evidență două feluri de colonii : unele galbene, prin fermentarea manitei și altele roz-roșcate, prin nefermentarea acesteia.

Coloniile manitopozitive sînt trecute pe bulion pentru subculturile necesare în activitatea ulterioară, activitate care vizează cercetarea celorlalte caractere de patogenitate ale stafilococului, și anume :

— *producerea de pigment*. Pentru aceasta, însămîntarea tulpinii se face pe mediu cu ser coagulat de bou sau mediu cu cartof și se examinează după 48 h la 22—25°C. Stafilococul patogen este cel auriu ;

— *cercetarea hemolizinei*. Stafilococul se însămîntează pe o placă cu geloză 2‰ și sînge defibrinat de iepure 5‰. După 24 h de termo-

statare ne putem găsi în fața unei lize complete, cu marginile bine limitate (hemoliză alfa) sau în fața unei zone de hemoliză cu limite neprecise, care se clarifică la rece (hemoliză beta) ;

— *cercetarea fibrinolizinei*. Stafilococul se însămânțează pentru a se obține colonii izolate pe o placă cu mediu geloză-plasmă pregătită astfel : la 7 părți geloză topită și răcită la 50°C se adaugă o parte plasmă tratată cu acid oxalic. Se omogenizează prin rotirea eprubetei, se încălzește 5 min la 56°C și se toarnă în plăci. După 24 h de termostatare mediul, care este mat, se clarifică, devenind astfel transparent în jurul coloniilor fibrinolizo-pozitive ;

— *cercetarea coagulazei*. Peste 0,3 ml plasmă oxalatată de om sau iepure se adaugă, într-o eprubetă de hemoliză, 0,2 ml cultură de stafilococ de 24 h în bulion. Se introduce la termostat și se controlează din 30 în 30 min timp de 4 ore, în prezența unui martor sigur coagulazo-pozitiv și a unuia sigur negativ.

În cazul în care stafilococul este obținut nu după mediul hiperclorurat, cum s-a arătat mai sus, atunci va trebui să-i cercetăm și posibilitatea de a fermenta manita și aceasta o vom face însămânțând tulpina în apă peptonată manitată 1% cu albastru de bromtimol sau turnesol ca indicator.

Stafilococul izolat pe una din cele două căi și căruia i-am stabilit caracterele de patogenitate va fi testat față de o gamă largă de antibiotice, avînd în vedere posibilitatea acestui germene de a se adapta destul de repede la antibioticele întrebuintate curent.

8.2. STREPTOCOCUL

Mai toate speciile de streptococ se găsesc frecvent pe pielea și în cavitățile naturale ale omului.

Recoltarea produsului se va face cu atenție.

Frotiul va arăta coci sferici sau ovalari, cu diametrul de 1 μ , dispuși uneori ca diplococi, frecvent însă în lanțuri a căror lungime este condiționată de specie. În culturile tinere sînt Gram-pozitivi, calitate ce poate fi pierdută în cele vechi sau în alte condiții defavorabile.

Creșterea și multiplicarea lor se face greu pe medii simple. Germenele reclamă prezența unor factori de creștere pe care îi furnizează adăugarea sîngelui, serului sau lichidului de ascită. Pe geloză-sînge streptococii se împart în patru categorii : *alfa-hemolitici* sau *viridans*, cei care produc o hemoliză incompletă, verzuie ; *alfa-prim-hemolitici*, cei ce produc o hemoliză incompletă ; *beta-hemolitici*, cei ce produc o hemoliză completă și cei *nehemolitici*.

Cu excepția enterococilor, streptococii sînt sensibili la sulfamide și antibiotice ; cei beta-hemolitici sînt foarte sensibili la penicilină, chiar după atîția ani de penicilinoterapie.

Streptococii patogeni pentru om fac parte din *grupa A*. Ei elaborează o serie de toxine, mai importante fiind cea eritrogenă sau scarlatinoasă și unele streptolizine, streptolizina „O” servind la diagnosticarea diferitelor afecțiuni streptococice prin prezența și prin titrul ei în serul bolnavilor.

Provoacă la om multiple și foarte variate afecțiuni. În afară de antibiotice și chimioterapice, în tratamentul afecțiunilor streptococice se întrebuintează vaccino- și seroterapia.

Produsul recoltat va fi transportat cît mai repede la laborator și luat imediat în lucru.

Frotiul examinat, mai ales cînd este vorba de o leziune deschisă, are un caracter informativ. Obligativ, se vor face însămînțări pe medii de cultură. Cel mai larg întrebuintat este *mediul cu geloză-sînge*. Însămînțarea se poate face pe suprafața mediului sau în profunzimea lui, ultima, prin semianaerobioza ce o realizează, oferă condiții mai bune de dezvoltare.

Coloniile de streptococ sînt mici, rotunde, translucide, cu sau fără hemoliză. Cîteva colonii cu aspectul caracteristic sînt trecute în bulion glucozat și după 18—20 h din nou pe geloză-sînge pentru verificarea hemolizei.

Pentru ca streptococul izolat dintr-o secreție purulentă să fie încadrat în *grupa A*, cea mai simplă și, deci, accesibilă metodă este *metoda sensibilității la bacitracină*. Numai streptococii din *grupa A* sînt inhibați de acest antibiotic.

8.3. PNEUMOCOCUL

Pneumococul, germen saprofit al mucoaselor, se găsește la nivelul căilor respiratorii superioare ale omului : nas, gură, faringe, în 50% din cazuri.

Sînt coci ovoizi, lanceolați („în flacără de lumînare”), dispuși diplo- și cu extremitățile bombate către exterior, Gram-pozitivi, înconjurați de capsulă.

Ca și streptococul, pneumococul necesită adăugarea de substanțe albuminoase de origine animală la mediile de cultură, pentru a se dezvolta. CO₂ este factorul care inițiază creșterea.

Bila și sărurile biliare au acțiune bactericidă și apoi litică asupra germenului, biloliza fiind un test care dă posibilitatea diferențierii pneumococului de streptococul viridans, cu care are foarte multe asemănări.

La om determină multe și variate afecțiuni. Exsudatul purulent este foarte fibrinos și prezintă reflexe verzui.

Fiind un germene foarte sensibil la antibiotice și chimioterapice, nu necesită decât foarte rar vaccino- și autovaccinoterapie.

Produsul, recoltat înaintea aplicării oricărei terapii, arată pe frotiu germeni cu aspectul caracteristic, înconjurați de capsulă. Însămânțarea se face pe plăci cu geloză-sînge incubate, de dorit, în atmosferă de CO₂. Coloniile sînt mici, transparente ca picăturile de rouă, în conjurate de o zonă de hemoliză verzuie (colonii asemănătoare pînă la un anumit punct cu ale streptococului viridans).

Dacă produsul conține și floră de asociație, atunci cea mai simplă metodă de izolare este cea care folosește inocularea subcutană la baza cozii unui șoarece alb de 15—20 g. Spre deosebire de toți ceilalți germeni ce rămîn cantonați la locul de inoculare, pneumococul determină o septicemie mortală, cu posibilitatea izolării lui din sînge și organe.

Cînd se pune problema identificării pneumococului, testul bilolizei îl deosebește categoric de streptococii cu care poate fi confundat. Același lucru se poate face folosind și sensibilitatea caracteristică față de optochin.

8.4. MENINGOCOCUL

Meningococul este un germene care se poate găsi în nazofaringele indivizilor sănătoși și bolnavi. Morfologia este caracteristică: coci ovalari, cu diametrul de 0,6—1 μ , reniformi, așezați diplo-, cu fețele turtite, dispuse față în față, Gram-negativi.

Nu se dezvoltă pe medii simple, ci numai pe medii îmbogățite cu lichide organice. Transportul produsului se va face ferit de lumină și la temperatura de 37°C, iar însămînțarea se va face imediat pe medii adecvate, care au fost încălzite în prealabil. Mediile vor fi termostătate în atmosferă de CO₂. Coloniile dezvoltate pe mediile solide, după 24 h, sînt colonii mici, rotunde, convexe, translucide, albe-cenușii, lucioase.

Întrucît în genul *Neisseria* se găsesc și germeni nepatogeni, a căror morfologie și afinitate tinctorială este identică meningococului, va trebui să se facă un diagnostic diferențial: *Neisseria catarrhalis* crește pe mediile simple și nu fermentează glucoza și maltoza — zaharuri pe care meningococul le fermentează.

Rezistența meningococului este foarte scăzută. Moare sub 24°C și peste 40°C . Mediul uscat și lumina îl distrug în câteva ore. Este sensibil la antibiotice și sulfamide.

În afara meningitei — principala afecțiune provocată — meningococul mai poate da localizări articulare, pleurale și endocardice.

Înainte antibioticelor și sulfamidelor, tratamentul era făcut, cu șanse oarecum limitate, cu ser antimeningococic. Astăzi, terapia modernă face ca totul să depindă de rapiditatea cu care se pune diagnosticul și, deci, de cea cu care se instituie tratamentul.

8.5. GONOCOCUL

Gonococul este un germene strict patogen pentru om, a cărui localizare este la nivelul căilor genito-urinare, dar și al cavității bucale.

În afara manifestărilor genitale, amintim oftalmia gonococică a adultului și a nou-născutului. Inițial, de culoare galben-verzuie, puroiul își schimbă culoarea și aspectul în momentul asocierii altor germeni.

Făcînd parte din genul *Neisseria*, pe frotiul făcut din exsudatul purulent (fig. 4) apar germeni cu morfologia și afinitatea tinctorială, asemănătoare meningococului, intra- și extracelulari. Nu crește pe medii uzuale.

Rezistența gonococului la agenții fizici și chimici este destul de scăzută, spre deosebire de rezistența la antibiotice, care este destul de ridicată.

Complicațiile sînt frecvente, iar cele articulare trebuie reținute.

Prezența acestor germeni într-o secreție uretrală sau conjunctivală lămurește destul de simplu diagnosticul. Lucrurile se complică, însă, atunci cînd aspectul nu este caracteristic și cînd trebuie făcute însămînțări.

Însămînțarea se va face pe medii îmbogățite, de preferat mediul Müller-Hinton, încălzite, iar termostatarea se va face în atmosferă de

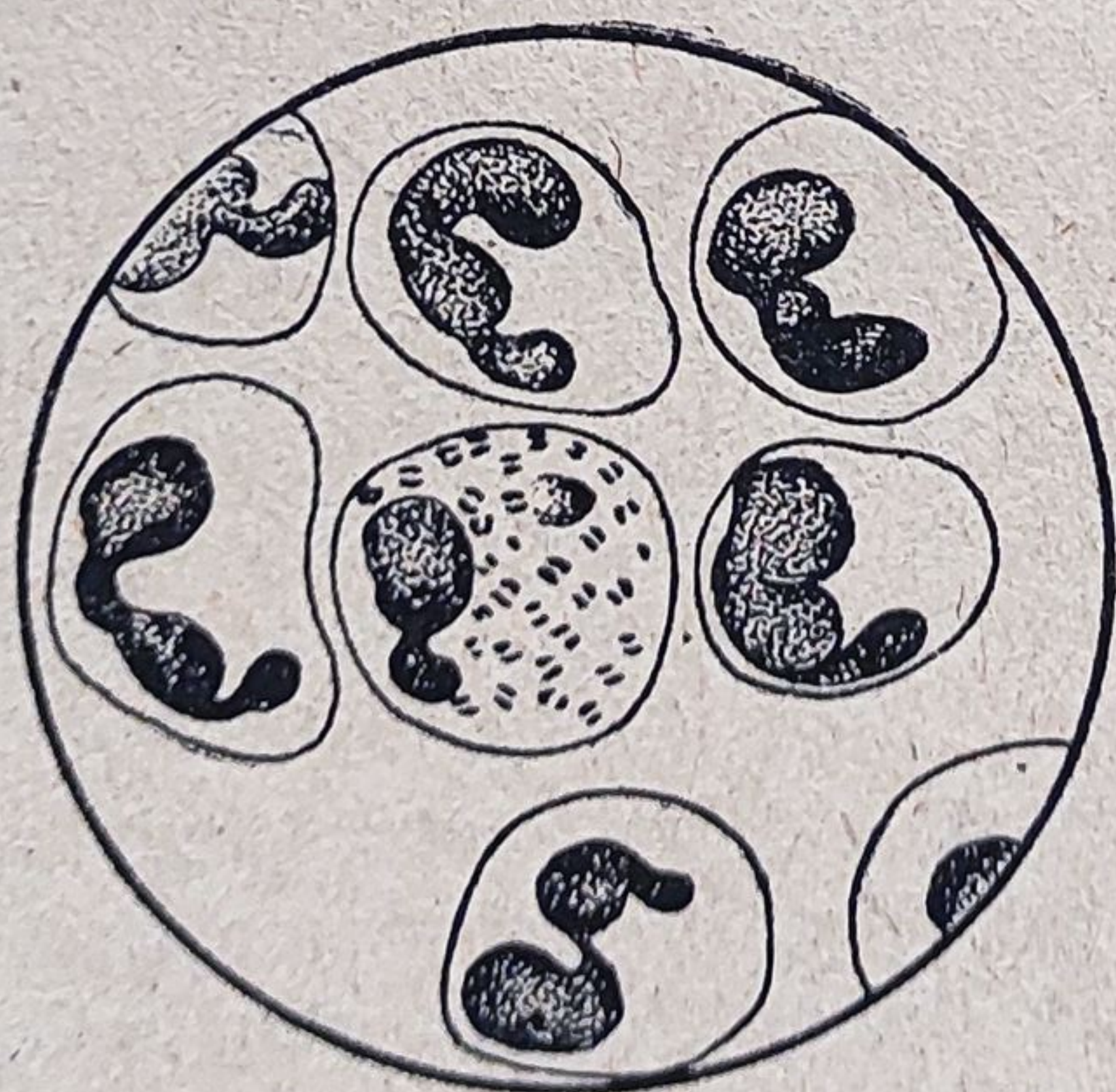


Fig. 4. Gonococul. (Frotiu din infecție acută — uretrită la bărbat.)

CO₂. Coloniile de gonococ sînt mici, translucide. Pentru identificare, reacția oxidazelor și fermentarea fructozei și nefermentarea maltozei permit diferențierea de neisseriile nepatogene.

8.6. PIOCIANICUL

Germenul răspîndit în natură, în apă, aer, sol, este frecvent întîlnit ca saprofit pe tegumente, în cavitățile naturale și intestinul omului și animalelor. Aceasta reclamă o atenție deosebită la recoltarea produselor.

Frotiul făcut pune în evidență bacili subțiri, lungi de 2—6 μ , Gram-negativi.

Crește pe mediile obișnuite. Mediile solide, după 24 h, se colorează în albastru-verzui și degajă un miros aromatic.

Este sensibil la antisepticele obișnuite, însă destul de rezistent la antibiotice.

Este întîlnit la om în diverse leziuni (plăgi, arsuri) infectate, în infecții otice, oculare, articulare etc. Caracteristica puroiului produs de piocianic este culoarea albăstrui.

În cadrul diagnosticului de laborator, produsul recoltat cu ajutorul unui tampon sau meșe va fi însămîntat pe medii obișnuite, lichide și solide. Tulburarea uniformă a bulionului, cu formarea unui vîl cenușiu, aderent la suprafața tubului, prezența pigmentului și mirosul caracteristic de floare de *Accacia* pe mediul solid lămuresc diagnosticul. Dacă este necesar să se meargă cu identificarea mai departe, atunci se va ține cont de faptul că piocianicul crește pe mediul care conține citrat ca unică sursă de carbon și produce hemoliză pe mediul geloză-sînge.

8.7. ESCHERICHIA COLI

Germenii încadrați în genul *Escherichia* se găsesc în mod normal în colonul oamenilor sănătoși și al unor animale, fapt ce face să fie foarte răspîndiți în natură.

Frotiul pune în evidență bacili Gram-negativi, de 2—3 μ lungime și 0,5 μ grosime, iar preparatul proaspăt bacili mobili. Fiind un germene nepretențios, crește pe mediile obișnuite, tulburînd uniform bulionul și dînd colonii rotunde, cu marginile regulate, netede, bombate pe geloză. Fermentează lactoza, produce indol, nu descompune ureea și nu produce acetil-metil-carbinol.

Bacilul coli este un germene rezistent în mediul exterior ; este sensibil la acțiunea dezinfectantelor frecvent folosite, însă destul de rezistent la acțiunea antibioticelor.

Însămînțările pe medii obișnuite, prin mirosul fecaloid pe care îl degajă, orientează spre b. coli. Pentru identificare, se întrebuintează medii care conțin lactoză și un indicator de culoare. În această categorie intră mediul A.A.B.T.L. Pe acest mediu, b. coli formează colonii de culoare galbenă (lactozo-pozitive).

Încadrarea definitivă în gen se va face în urma confruntării față de testul I.M.V.C.

8.8. PROTEUSUL

Germenii din acest gen sînt bacili Gram-negativi, lungi de 1—4 μ și groși de 0,5 μ și foarte mobili.

Cresc ușor pe mediile de cultură simple, tulburînd uniform bulionul, formînd un vâl la suprafață și degajînd un miros putrid. Mediile solide sînt invadate. Sînt rezistenți în mediul extern și mai rezistenți la dezinfectante decît ceilalți germeni. Puține sînt antibioticele la care proteusul este sensibil.

Produsul patologic însămînțat la baza unui tub cu geloză înclinată permite ca după 24 h de termostatare să se pună diagnosticul, datorită proprietății de „cătărare“. Cu ajutorul aceluiași fenomen este posibilă și izolarea proteusului, atunci cînd el se găsește în asociere cu alți germeni.

8.9. BACILUL FRIEDLÄNDER

Bacilul Friedländer poate fi întîlnit într-o serie de afecțiuni la om.

Pe frotiu se pune în evidență un bacil scurt, Gram-negativ, nesporulat și înconjurat de o capsulă, uneori dispus diplo. Pe preparatul proaspăt bacilul este imobil.

Crește pe mediile uzuale, pe bulion, formînd un vâl gros la suprafață, iar pe geloză colonii albe-cenușii cu aspect mucos. Germenii fermentează lactoza și nu produc indol și hidrogen sulfurat. Sînt rezistenți luni de zile în mediul extern, dar sensibili la substanțele antiseptice obișnuite și la unele antibiotice.

La om, acest bacil poate fi găsit în pneumonii, pleurezii, otite, colecistite, conjunctivite și ulceratii ale corneei.

Prezența unor bacili Gram-negativi scurți, înconjurați de capsulă pe frotiul făcut din produsul patologic, orientează către bacilul Friedländer.

Confirmarea diagnosticului va fi făcută prin punerea în evidență în bulionul însămînțat a vâului viscos și a coloniilor cu aspect mucos, ce curg cînd însămînțarea s-a făcut pe geloză înclinată.

8.10. BRUCELLA

Germenii din genul *Brucella* provoacă frecvent procese supurative la om. Bruceloza este o zoonoză foarte răspîndită pe glob.

Pe frotiul colorat Gram se pun în evidență germeni de formă cocobacilară, măsurînd 0,5—0,7 μ , Gram-negativi. Deși sînt germeni aerobi, totuși, pentru cultivare, este necesară incubarea în atmosferă de CO₂ 10%. Germenii nu cresc pe medii obișnuite, ci numai pe medii speciale ca : geloză-ficat.

Brucelele sînt foarte rezistente în mediul extern : în praful uscat rezistă pînă la 2 luni, în apă pînă la 20 de zile, iar în lenjeria poluată pînă la 80 de zile. Antisepticele sînt foarte eficace, ca și marea majoritate a antibioticelor.

Exsudatul purulent va fi însămînțat imediat pe mediul geloză-ficat și bulion-ficat, întrucît examenul bacterioscopic direct dă rezultate incerte. Incubarea se va face și în atmosferă de CO₂ 10%. Coloniile dezvoltate pe mediile solide sînt mici și transparente la început, pentru a deveni apoi opace, cu aspect de porțelan. Culturile pozitive sînt controlate prin frotiuri colorate Gram. Cu ajutorul unui ser aglutinant antibrucelos, germenele poate fi identificat ca făcînd parte din genul *Brucella*.

Pentru stabilirea speciei se va face uz de modul de producere a hidrogenului sulfurat și de modul de comportare pe medii solide ce conțin tionină și fuxină.

8.11. GERMENII GANGRENEI GAZOASE

Gangrena gazoasă este o toxiinfecție gravă, o complicație a rănilor de glonț sau accidentale, rareori și a plăgilor chirurgicale, provocată de o asociație de germeni anaerobi și aerobi. Există și o gangrenă gazoasă, zisă „medicală“, care este consecința unei injecții medicamentoase : de exemplu, adrenalina, chinina, uleiul camforat, clorura de calciu. Sporii germenilor pătrund o dată cu medicamentul sau prin instrumentele folosite și care nu au fost bine sterilizate.

Frotiul făcut din serozitatea tulbure cu miros fetid pune în evidență o floră foarte polimorfă, Gram-pozitivă și negativă, cu germeni sporulați și nesporulați. Însămînțarea se va face pe medii aerobe și anaerobe.

Tehnicile pentru realizarea anaerobiozei sînt multiple. Cea mai simplă și mai comodă, care dă posibilitatea obținerii de colonii izolate cu tot ce au ele caracteristic este următoarea: produsul patologic se însămînțează pe suprafața unei cutii Pétri cu geloză-sînge, cutie cu diametrul de cel puțin 15 cm. Pe fața capacului, cu ajutorul unei fișii de leucoplast, se prinde un amestec reductor format din: KCO_3 1 g, pirogalol 1 g, terra silicae 3 g. Se întoarce fundul cutiei cu mediul însămînțat peste plicul prins pe capac și se parafinează suprafețele de contact ale celor două capace. Se realizează, astfel, un spațiu închis, în care amestecul reductor realizează o anaerobioză perfectă.

Germenii anaerobi patogeni cei mai frecvent întîlniți în gangrena gazoasă sînt: *Clostridium perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum* și *Cl. histolyticum*.

Tot în cadrul temei „examenul secrețiilor purulente“, trebuie amintite și cercetările bacteriologice ce se cer a fi făcute secrețiilor conjunctivale, produse patologice ce se întîlnesc destul de frecvent în laboratoarele care servesc servicii de oftalmologie.

Punerea în evidență pe frotiu a unor bacili Gram-negativi, foarte scurți și fini, izolați, dispuși diplo-, uneori în lanțuri, intra- și extra-celular, orientează spre *bacilul lui Weeks*. Acest germene se cultivă în aerobioză pe geloză-sînge fiert, mediu pe care dă colonii mici, transparente. Este agentul etiologic al **conjunctivitei acute contagioase a copiilor** de școală.

Dacă pe frotiu se văd germeni Gram-negativi, groși, cu extremitățile rotunjite și ușor umflate, care se cultivă greu și numai pe medii îmbogățite cu lichide organice, este vorba de *Moraxella lacunata*, **germenele conjunctivitei subacute și cronice a adultului**.

Tema 9

EXAMENUL EXSUDATULUI FARINGIAN

Ca orice cavitate, cavitatea bucofaringiană este populată cu o mulțime de specii microbiene, majoritatea saprofite, dar care pot fi, în anumite condiții, responsabile de producerea unor **angine, abcese și stomatite**. La acest nivel se întîlnesc, însă, și germeni patogeni ca: *bacilul difteric*, *meningococul*, *stafilococul* și *streptococul hemolitic* etc.

9.1. TEHNICA DE RECOLTARE

Recoltarea se face la nivelul rinofaringelui, cu un porttampon cu vată nehidrofilă, sterilizat la pupinel. Bolnavul este așezat pe un scaun spre lumină. Se folosește un apăsător de limbă pentru o mai bună vizualizare. Locurile de elecție sînt : criptele amigdalene, spațiul dintre pilierii vîlului palatin sau peretele posterior al faringelui. Cînd se caută meningococul, recoltarea se va face din spațele lîetei, cît mai sus posibil. În cazul anginei cu false membrane se va urmări detașarea unui fragment de membrană la periferia leziunii. Recoltarea se face pe nemîncate sau la cel puțin 3 h după masă.

Recoltarea mai poate fi făcută și pe cale nazală și atunci se folosește un porttampon metalic subțire, care va fi introdus în lungul peretelui fosei nazale. Această cale este obligatorie în cercetarea stării de purtător, ca și în cercetarea cocobacilului pertussis și a meningococului.

Operațiunea recoltării va fi efectuată înainte de instituirea unui tratament.

9.2. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL EXSUDATULUI FARINGIAN

Transportate cît mai repede la laborator, în cazul meningococului, ferite de lumină și la temperatura de 37°C, exsudatele vor fi luate în lucru în cel mai scurt timp. În primul rînd se fac însămînțări pe mediile de cultură solicitate de germene, cînd acesta este cunoscut, sau pe medii variate, cînd germenele este necunoscut. În timpul următor se fac frotiuri. Informațiile obținute sînt de cele mai multe ori orientative. Puține sînt situațiile cînd diagnosticul se poate preciza numai cu acest frotiu. Este cazul diagnosticului de angină fusospirilară Vincent.

În cazul cercetării stafilococului, tamponul va fi descărcat în 5 ml apă distilată și aceasta însămînțată într-un volum egal de mediu hiperclorurat lichid din care, după 36 h de termostatare, se vor face diseminări pe suprafața unor plăci cu mediu hiperclorurat solid. Coloniile galbene, manito-pozitive, vor fi controlate pentru a se pune în evidență celelalte caractere de patogenitate.

Streptococul β -hemolitic se cercetează prin însămînțări pe geloză-sînge. După 24 h apar colonii mici, fine, înconjurate de o zonă de hemoliză clară cu marginile nete. Pentru încadrarea lui în grupul A se va folosi testul sensibilității la bacitracină.

Pentru cultivarea meningococului, tamponul va fi descărcat pe geloză-sînge, geloză-ascită sau geloză-ser. Coloniile ce apar după 24 h de termostatare sînt mici, rotunde, cu marginile regulate, ce-

nușii-albăstrui, sclipitoare. Diferențierea de *Neisseria catarrhalis*, cu care poate fi confundat, se face prin aceea că aceasta din urmă nu fermentează glucoza și maltoza.

Cînd investigația se face pentru *bacilul difteric*, se vor recolta trei tampoane din rinofaringe și unul din cavitatea nazală. Cu primul tampon se fac frotiuri ce se vor colora Gram și Del Vechi, tamponul doi se însămîntează pe mediile de cultură, iar tamponul trei se însămîntează pe mediul de îmbogățire O.C.S.T.

Pe frotiul colorat Gram se pun în evidență bacili Gram-pozitivi la limită, de 3—8 μ , măciucați, grupați în formă de palisadă sau în grămezi ca bețele de chibrit aruncate pe masă (în V.Y.L.).

Mediile folosite în diagnosticul difteric sînt: Tinsdale, Gundel-Tietz, Löffler, geloză-sînge.

— Pe mediul Tinsdale, cel mai recomandat, coloniile diftericului sînt negre cu halou cafeniu. Haloul este caracteristic. Acest mediu permite ca în 24 h să se diagnosticheze 98% din cazuri. În caz negativ, examinarea se va face după 48 h. Pe acest mediu coloniile pseudodiftericilor sînt inhibitate, iar dacă se dezvoltă, ele sînt mari, negre, fără halou.

— Pe mediul Gundel-Tietz coloniile sînt negre și permit deosebirea celor trei tipuri.

— Pe geloză-sînge coloniile sînt gri ca perlele, cu suprafața ușor granulată, friabile.

— Pe mediul Löffler coloniile sînt albe, ușor granulate.

Coloniile suspecte, controlate pe frotiu, vor fi însămîntate pentru probele minime de identificare: producerea de H_2S , de urează, fermentarea glucozei și a zaharozei.

Dacă, însă, la examinarea plăcilor nu se pun în evidență colonii suspecte, atunci tamponul care a fost însămîntat în mediul de îmbogățire O.C.S.T. se diseminează pe mediile de cultură arătate și se procedează în continuare ca mai sus.

Tema 10

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SPUTEI

Prin *spută* se înțelege totalitatea secrețiilor patologice eliminate prin tuse, provenind din inflamația aparatului respirator.

Interpretarea rezultatelor obținute în urma examinării acestui produs este de o valoare incontestabilă în stabilirea etiologiei dife-

ritelor afecțiuni pulmonare. Este, însă, necesar ca la laborator să ajungă un produs concludent.

Recoltarea se face de preferat dimineața, când trecerea de la poziția clinostatică la cea ortostatică provoacă în mod normal un reflex de tuse și, deci, de eliminare a secrețiilor acumulate în timpul nopții. Bolnavul va face în prealabil o gargară cu ser fiziologic steril, pentru îndepărtarea mecanică a secrețiilor, descuamărilor și a germenilor aflați în mod normal la nivelul cavității bucofaringiene.

Recoltarea se va face într-un vas steril cu deschidere largă, de preferat cutie Pétri.

În cazuri speciale se va examina aspiratul bronșic recoltat în urma unei bronhoscopii, iar la copiii care nu pot expectora, aspiratul gastric.

Examenul începe cu aprecieri macroscopice privind aspectul, consistența, culoarea, mirosul și cantitatea sputei, unele informații avînd valoare deosebită.

În continuare, se vor desfășura o serie de operațiuni care vor urmări să pună în evidență prezența unor elemente celulare, elemente histologice necelulare, elemente minerale, germeni și paraziți.

10.1. ELEMENTE CELULARE ȘI NECELULARE

Elementele celulare. Pe frotiuri subțiri, colorate May-Grünwald-Giemsa și examinate cu atenție, se pot evidenția următoarele tipuri de celule :

— *celule epiteliale plate*, mari, poliedrice, izolate sau în placarde, provenind din cavitatea bucofaringiană și pe suprafața căroră se găsesc germeni nefagocitați ;

— *celule epiteliale cilindrice*, alungite și cu cili, provenind de la nivelul traheobronșic ;

— *celule alveolare*, asemănătoare cu monocitul sau limfocitul mare, numeroase în procesele inflamatorii pulmonare ;

— *celule macrofage*, cu diametrul între 25—50 μ , rotunde sau ovale și cu nucleu excentric ;

— *celule sanguine* : neutrofile, în cantitate mare în procesele purulente : eozinofile, ce pot ajunge pînă la 60% în astmul bronșic, limfocite în tusea convulsivă și eritrocite în hemoragiile pulmonare.

Elementele histologice necelulare ce se pot găsi în spută sînt: spiralele *Curschmann* și fibrele elastice. Primele, prezente în sputele astmaticilor, se evidențiază pe preparate proaspete, examinate cu obiectiv uscat, și apar ca niște filamente fine, spiralate, uneori cu centrul mai strălucitor. Fibrele elastice, prezente în tuberculoza pulmonară și astmul bronșic, se pun în evidență examinînd, tot cu obiectiv uscat între lamă și lamelă, sedimentul centrifugat al unei mici porțiuni de spută tratată cu NaOH 10%, încălzită pînă la fierbere, la care se adaugă apoi 8—10 picături de soluție alcoolică de eozină 1%. Fibrele apar galbene-portocalii, cu dublu contur și, uneori, cu dispoziție alveolară.

Trebuie, de asemenea, amintite, pentru că sînt solicitate de clinicieni, *cristalele Charcot-Leyden*, cu aspect de romburi incolore, cu marginile netede și capetele ascuțite, care pot fi găsite în astmul bronșic, chistul hidatic pulmonar și tuberculoza pulmonară. Punerea lor în evidență se face pe preparate proaspete, între lamă și lamelă, examinate însă cu imersie.

10.2. GERMENI ȘI PARAZIȚI

În procesele inflamatorii ale aparatului respirator se poate întîlni o mare varietate de germeni, mai frecvent cercetați fiind: *pneumococul*, *streptococul*, *stafilococul*, *Klebsiella*, *enterococul*, *colibacilul*, *Haemophilus influenzae*, *micrococul cataral*, *piocianicul*, *proteusul* și *bacilul Koch*.

— *Pneumococul*, care imprimă sputei aspectul vîscos și culoarea ruginie, este întîlnit în pneumonia lobară acută, în bronhopneumonie, abcese pulmonare și congestii.

Germenele se pune ușor în evidență pe frotiurile examinate, aspectul de diplo- al unor coci Gram-pozitivi lanceolați și înconjurați de capsulă fiindu-le caracteristic. Dacă numărul germenilor este mare, tipul poate fi identificat cu ajutorul fenomenului de umflare al capsulei cu ajutorul serurilor specifice de tip I, II și III. Cînd numărul este redus se poate trece la izolare și identificare, fie uzînd de mediile de cultură cunoscute, fie de metoda rapidă a folosirii șoarecelui alb, la care sputa omogenizată cu ser fiziologic steril este inoculată în cantitate de 0,5 ml subcutan, la baza cozii. *Pneumococul* provoacă în 24 h o septicemie mortală, care permite izolarea lui în cultură pură din cord, întrucît germenii de asociație rămîn cantonați la locul de inoculare.

Identificarea se face prin : fenomenul de bioliză, testul la optochin, fermentarea inulinei și reacția de aglutinare.

— În legătură cu ceilalți germeni prezenți în spută amintim gravitatea deosebită a afecțiunilor provocate de *Klebsiella* și de stafilococi în spitale, ca și de *Haemophilus influenzae* la nou-născuți, care provoacă edemul marcat prin obstruarea conductului traheobronșic ce duce, în timp scurt, la moarte.

— O atenție deosebită trebuie acordată examenului bacteriologic al sputei, pentru cercetarea *bacilului Koch*.

Examenul începe prin efectuarea unor frotiuri, de preferat pe lame neîntrebuințate, colorate Ziehl-Neelsen. Acestea trebuie examinate cu deosebită atenție. După cum frecvența germenilor pe frotiu nu arată gravitatea bolii, tot așa absența lor nu exclude diagnosticul tuberculozei.

În cazul unui examen bacterioscopic negativ se recurge la **metode de omogenizare**. Aceste metode, prin acizii sau bazele folosite, substanțe ce distrug rețeaua de fibrină, dau posibilitatea bacililor să fie concentrați pe o suprafață mică prin centrifugare sau flotare. În *omogenizarea acidă* se folosește acid sulfuric 15%, iar în cea *alcalină* hidroxid de sodiu 6%. Sputa tratată cu una din soluții se termostatează pînă la completa omogenizare, după care se centrifughează 30 min la 3 000 rotații. Sedimentul se întinde pe lame umectate în prealabil cu albumină Meyer.

Metoda flotației este un procedeu superior de investigare.

Este o omogenizare în care se întrebuițează hidroxid de sodiu 0,5%. Balonul, după agitare, se introduce la baie de 60°C, timp de 30 min, agitându-se din cînd în cînd. Se adaugă 2 ml xilol și 50 ml apă distilată. Se astupă bine balonul și se agită puternic 10 min și apoi se lasă în repaus o oră. Stratul de xilol adunat la gîtul balonului se aspiră cu o pipetă cu pară. Pe o lamă de sticlă, încălzită pe o platină, se depun două picături. După uscarea acestora, se repetă operația pînă la epuizarea stratului. Se realizează, astfel, două picături stratificate, care, după uscare și degresare cu eter, se colorează Ziehl-Neelsen.

Diagnosticul de laborator se completează însă cu însămînțări pe **medii speciale**, operație care mărește considerabil șansele de punere în evidență a b. Koch în produsele sărace. (Mediile întrebuițate sînt Löwenstein și Jensen.)

Tratată într-un vas steril cu acid sulfuric 6%, sputa se ține la termostat o oră, după care este neutralizată în prezența albastrului de bromtimol cu hidroxid de sodiu 6%, pînă la culoarea verde-albăstruie. Cu o pipetă Pasteur se repartizează în cel puțin 6 eprubete cu mediu cîte 8—10 picături. Eprubetele se incubează la 37°C, înclinate pînă la evaporarea lichidului, după care se parafinează. Se examinează zilnic în prima săptămîină, îndepărtîndu-se tuburile infectate și, în continuare, săptămînal, timp de 3 luni.

Coloniile b. Koch apar după 10—15 zile, sub forma unor puncte albe-gălbui, care măriindu-se fuzionează devenind rugoase, plate. Coloniile dezvoltate vor fi controlate morfologic și tinctorial.

O altă metodă de examinare a sputei o dă și **inocularea la cobai** (un singur b. Koch este în stare să tuberculizeze animalul). Se folosesc cobai masculi sănătoși, de 350—400 g, cu reacția negativă la tuberculină. Se inoculează pe partea internă a coapsei posterioare, subcutan, 1—2 ml spută omogenizată și neutralizată. Animalului izolat i se vor administra în primele zile alimente pudrate cu sulfamide.

În cazul prezenței b. Koch, după două săptămîni cobaiul începe să mănînce mai puțin, devine indiferent; la palpare prezintă la locul de inoculare o împăstare, care în zilele următoare devine fluctuantă și apoi abcedează. Ganglionii inghinali de partea respectivă se hipertrofiază, iar reacția la tuberculină se pozitivează. Din a patra săptămîină apare febra — peste 39,5°C — și animalul slăbește vizibil, ceea ce face ca în scurt timp să devină cașectic. La autopsia ce se va practica obligatoriu, se va cerceta prezența b. Koch în puroiul ganglionar, în splină și ficat. Cînd este vorba de o spută foarte săracă în bacili, evoluția bolii la cobai se va face mult mai lent, ceea ce obligă ca animalul să fie urmărit cu atenție mai multe luni.

Unele procese pulmonare pot avea ca agenți etiologici **paraziți animali sau vegetali**.

Cei animali se pun în evidență pe preparate proaspete, între lamă și lamelă, prin examene directe sau după omogenizare. Frecvent se pune diagnosticul de *paragonimiază*, ouăle parazitului eliminîndu-se prin spută și diagnosticul de *chist hidatic pulmonar*, prin evidențierea cîrligelor caracteristice, însă numai atunci cînd chistul a fistulizat în căile respiratorii. Rar se pot evidenția larve de *Ascaris lumbricoides*, *Strongiloides stercoralis* și *Ancylostoma duodenale*.

Paraziții vegetali pot fi: *Candida*, *Geotrichum* și *Aspergillus*.

Tema 11

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SECREȚILOR GENITALE

Uretra persoanelor sănătoase, exceptînd porțiunea anterioară unde se pot găsi specii bacteriene saprofite, nu conține floră bacteriană. Apariția unei secreții uretrale este considerată proces patologic infecțios.

Secreția vaginală este un transsudat al mucoasei vaginale care conține celule epiteliale de descuamare și germeni variabili biologic, în funcție de diferiți factori, cum sînt : vîrsta, stările fiziologice, stările patologice etc. De la pubertate și pînă la menopauză cavitatea vaginală a femeii sănătoase este populată de bacili lactici, care scindează glicogenul cu formare de acid lactic și, respectiv, scăderea pH-ului local, care împiedică dezvoltarea bacteriilor patogene.

Sînt cunoscute cîteva boli microbiene specifice aparatului genito-urinar.

11.1. SIFILISUL

Diagnosticul de laborator al sifilisului constă din *examenul bacteriologic direct* al produselor patologice recoltate din leziunile sifilitice, pentru punerea în evidență a *Treponemei pallidum* (fig. 5), și din *examene indirecte* pentru depistarea anticorpilor specifici în serul sanguin sau în lichidul cefalorahidian al bolnavilor.

Recoltarea serozității se face direct din șancru și din plăgile mucoase, folosind o pipetă Pasteur.

Mai întîi, însă, suprafața leziunii este curățată atent cu un tampon de vată sterilă înmuiată în ser fiziologic sau în apă sterilizată prin fierbere. Din șancru se aspiră serozitatea de la marginea leziunii, unde treponemele sînt numeroase.

Examinarea. Serozitatea din șancru este examinată direct pe fond întunecat sau pe frotiuri colorate.

— *Examenul microscopic al preparatelor proaspete pe fond întunecat.*

La un microscop obișnuit, cu o sursă de lumină puternică, preferabil o lampă cu filament punctiform, cu voltaj mic și amperaj mare, se înlocuiește condensatorul de lumină Abbé cu un condensator special, cardioid sau paraboloid, ceea ce realizează fondul negru, cu porțiunea centrală opacă prin care razele centrale ale fasciculului luminos nu mai pătrund

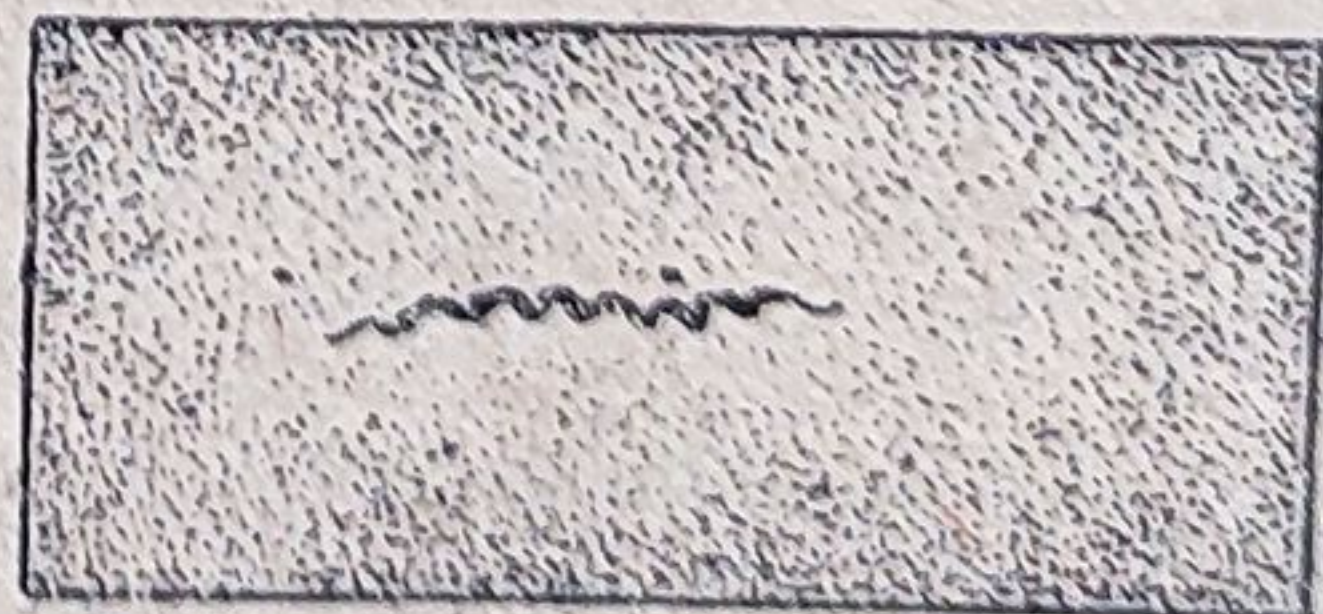


Fig. 5. *Treponema pallidum*.

direct spre ochiul observatorului; o parte din razele luminoase din părțile laterale ale condensatorului sînt reflectate de microorganismele din serozitate, care apar clar conturate pe fondul întunecat al cîmpului microscopic. Cu o picătură din serozitatea șancrului se face un preparat proaspăt între lamă și lamelă, care este montat pe platina microscopului; se pune cîte o picătură de ulei de cedru sau glicerină pe lamelă și pe condensator, care este ridicat pînă face contact cu lama. Examinarea se face cu obiectivul cu imersie. Treponemele, luminate intens, prezintă o mișcare de rotație axială destul de rapidă, însoțită de o mișcare ondulatorie mai slabă și care se propagă de la un capăt la celălalt.

— *Examinarea treponemelor pe frotiuri colorate.*

Colorația prin impregnare argentică (metoda Fontana-Tribondeau):

— frotiul, uscat la aer, nu se fixează la flacără;

— pentru fixare și dezhemoglobinizare se acoperă frotiul cu soluție Rügge (2 ml formol, 1 ml acid acetic și 100 ml apă distilată), care trebuie schimbată de 3 ori în decurs de 1 minut;

— se spală frotiul cu apă distilată și se acoperă cu soluție de acid tanic (acid tanic 5% în apă distilată fenicată 1%) pînă la emisie de vaporii. Această soluție, cu rol de mordant, se menține pe lamă 3 min;

— frotiul se spală cu apă distilată și se colorează cu soluție amoniacală de nitrat de argint 5% în apă distilată, 10 min, fiind încălzit pînă la emisie de vaporii;

— se spală cu apă distilată, se usucă și se examinează cu obiectivul cu imersie.

Treponemele apar colorate în negru-brun, iar restul frotiului în galben.

Colorația Giemsa:

Frotiul uscat este fixat cu alcool metilic sau cu soluție May-Grünwald, 1—5 min;

— se spală frotiul cu apă distilată neutră, după care se introduce 8—24 h în soluție Giemsa (3 picături colorant la 2 ml apă distilată neutră), pentru colorare;

— se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează cu imersie.

Treponemele apar colorate în violet-roșcat.

Cultivarea treponemelor este posibilă prin inocularea intrateșticulară, la iepure, a serozității obținute din șancru sau din leziunile secundare, a lichidului obținut prin puncție ganglionară sau a unor fragmente de țesut recoltate din organe.

Cînd boala este într-un stadiu mai avansat, examenul bacteriologic direct este de obicei negativ. În asemenea cazuri, diagnosticul poate fi precizat prin **reacții serologice**. Pentru depistarea sifilisului

în colectivități se folosește o reacție de floculare, preferabil micro-reacția cu antigen cardiolipinic (VDRL) și o reacție de fixare a complementului (RFC).

Precizarea bolii și controlul evoluției ei atît în cursul tratamentului, cît și după acesta, face obligatoriu diagnosticul complex prin RFC cu antigen Bordet-Ruelens și antigen cardiolipinic și prin 2—3 reacții de floculare.

În anumite cazuri sînt necesare teste serologice specifice ca : RFC cu antigene treponemice, testul de imobilizare a treponemelor (Nelson și Mayer), reacția de imunofluorescență și testul de hemaglutinare.

11.2. GONOREEA

Este produsă de gonococ (*Neisseria gonorrhoeae*) (v. fig. 4).

Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor gonococice se face prin : recoltarea produselor patologice, recunoașterea morfologiei microscopice a gonococului pe frotiuri din produsele patologice (posibilă numai în infecțiile acute), însămînțarea produselor pe medii adecvate de izolare, identificarea biochimică prin reacția oxidazei și însămînțare pe medii zaharate (gonococii fermentează numai glucoza) și efectuarea antibiogramei.

Recoltarea produselor patologice. De la femeie, secrețiile mucopurulente uretrale, endocervicale, vaginale sînt recoltate cu o ansă bacteriologică sterilizată prin flambare și bine răcită. Recoltarea se face din colul uterin cu ajutorul valvelor ; pot fi folosite și tampoane montate pe țije subțiri. Se precizează că prelevările sînt făcute imediat după menstruație, simultan din col, uretră și rect. În gonoreea cronică se încearcă reactivarea infecției prin instilații cu nitrat de argint, vaccin tifoidic, prin băuturi alcoolice. De la bărbații cu infecție cronică și secreție redusă se recoltează „picătura matinală” înainte ca bolnavul să fi urinat și, preferabil, după un masaj prealabil de prostată.

Din produse se fac frotiuri care se colorează prin metoda Gram (se preferă fixarea cu alcool metilic, 5 min). Se cercetează reacția leucocitară și diplococii Gram-negativi intra- și extracelulari.

Medii de cultură pentru transportul produselor patologice și pentru izolarea și identificarea gonococului

a. Mediul de transport Stuart, modificat de Reyn. Se topește prin fierbere în 100 ml apă distilată dechlorinată 1,5 g agar, după care se adaugă 50 ml glicerofosfat de sodiu 20%, 0,95 ml acid tioglicolic 80%.

1 ml clorură de calciu 10%, 2 ml albastru de metilen soluție apoasă 0,1%. Se ajustează pH-ul la 7,4, se repartizează în tuburi 16/160 mm sterile, în coloană de 10 cm înălțime. Se autoclavează 1 h la 100°C și se păstrează la +4°C, la întuneric, fiind bun de folosit atâta timp cât coloana de mediu incolor la fundul tubului este de cel puțin 3 cm.

b. **Mediul neselectiv** (Virginia Dimache). Se topesc 120 ml mediu de bază Mueller-Hinton gelozat, se răcește la 45—50°C, se adaugă 21,5 ml supliment de îmbogățire neselectiv, se omogenizează și se repartizează în plăci Pétri și în eprubete.

c. **Mediul selectiv** (Virginia Dimache). Se topesc 120 ml mediu de bază Mueller-Hinton și, după răcire la 45—50°C, se adaugă 25,5 ml supliment de îmbogățire selectiv și 4,5 ml suspensie apoasă de nistatină cu 500 UI/ml, preparată extemporaneu. Se repartizează în plăci Pétri.

d. **Mediul Peizer-Steffen** este constituit din mediul 1 și 2.

Mediul 1. Se dizolvă în 1 000 ml apă distilată, la fierbere, 20 g peptonă peptică, 5 g NaCl și 25 g agar. Se ajustează pH-ul la 7,4 cu soluție 10% de fosfat disodic și se repartizează în baloane porții măsurate după necesități. Se sterilizează în autoclav 20 min, la 120°C.

Mediul 2. La 100 ml mediu 1 topit și răcit la 45—50°C se adaugă 30 ml mediu 2 preparat astfel: 15 ml plasmă sterilă de cal, 25 ml hemoglobină sterilă de cal 5% (5 ml hematii de cal + 96 ml apă distilată sterilă), 0,35 ml soluție sterilă de glucoză 30% și 5 ml soluție sterilă de fosfat disodic 15%. Amestecul se toarnă în plăci Pétri și în tuburi care se înclină pe loc.

e. **Mediul pentru fermentarea zaharurilor** (Virginia Dimache). La 100 ml mediu Mueller-Hinton, topit și răcit la 45—50°C, se adaugă, în mod steril, 10 ml ser normal de bou (sau cal), 10 ml autolizat proaspăt de drojdie de bere, 10 ml soluție sterilă de zahăr 10%, 1,4 ml soluție apoasă sterilă 0,2% de roșu fenol. Mediul rezultat este repartizat câte 2 ml în tuburi sterile de aglutinare, care se înclină pe loc. Însămînțarea este făcută bogat cu ansa, iar incubarea este obligatorie în exicator cu CO₂ 5—10%. Gonococul fermentează glucoza, virînd culoarea mediului de la roz-portocaliu la galben-călmîia.

Secrețiile sînt însămînțate pe plăci cu mediu selectiv și neselectiv, făcînd dispersii cu ansa pentru obținerea de colonii izolate; incubarea se face obligatoriu în exicator cu atmosferă de CO₂ 5—10%, realizată prin procedeul lumînării aprinse, timp de 24—48 h. Se urmărește apariția coloniilor mici, translucide de gonococ, care

sînt repicate pe mediul neselectiv ; se efectuează, concomitent, controlul microscopic pe frotiuri colorate Gram și reacția oxidazei, care este pozitivă.

Cultura rezultată este cercetată pentru fermentarea zaharurilor prin însămînțări pe medii cu glucoză, maltoză, levuloză, zaharoză și lactoză, precum și pentru sensibilitatea la chimioterapice și antibiotice (antibiograma), folosindu-se plăci cu mediu neselectiv și procedeul difuzimetric cu microcomprimate standardizate.



Fig. 6. *Haemophilus ducreyi*.

11.3. ȘANCRUL MOALE

Este provocat de *Haemophilus ducreyi* (fig. 6), care produce o leziune genitală specifică.

Recoltarea secreției se face de sub marginile dezlipite ale ulcerăției, în urma unei compresiuni la baza acesteia. Pe frotiul colorat Gram se pun în evidență bacili Gram-negativi, de 1,2—2 μ lungime, 0,5—1 μ grosime, colorați mai intens la capete, avînd aspectul de suveică și fiind dispuși în lanțuri scurte, uneori paralele.

Întrucît în ulcerățiile vechi microbul poate fi mascat de flora asociată, în caz de examen negativ, după două zile de tamponări cu ser fiziologic se repetă examenul microscopic.

Pentru cultivarea germenului se întrebuintează geloză-sînge pe care se obțin colonii rotunde, izolate, transparente, înconjurată de o zonă mică de hemoliză.

11.4. TRICHOMONAZA



Fig. 7. *Trichomonas vaginalis*.

În vulvovăginocervicitele cu *Trichomonas* (fig. 7) se constată o secreție abundentă de culoare verzuie sau ușor sangvinolentă, spumoasă, cu miros caracteristic de varză murată.

Recoltarea secreției vaginale se face cu ansa sau cu o mică spatulă, din fundul de sac lateral sau posterior.

utilizînd valvele pentru îndepărtarea pereților vaginului. Nu se vor folosi tamponane de vată sau comprese, deoarece fibrele de bumbac rețin parazitul. Exsudatul uretral se recoltează din meat, cu ansa sau cu o chiuretă specială. La femei, recoltarea se mai poate face din colul uterin și chiar din uter.

La bărbați se poate recolta exsudatul din șanțul prepuțial, din uretră sau lichid prostatic, după un masaj al acesteia.

De asemenea, la ambele sexe, parazitul va fi cercetat și din sedimentul urinar.

Metode de punere în evidență a parazitului

Examenul parazitului viu. Pe o lamă ușor încălzită se pune o picătură din secreția recoltată, care se amestecă cu o picătură de soluție cloruro-sodică izotonică caldă. Se acoperă lama cu o lamelă și se examinează imediat la microscop.

Pentru ușurința examinării se poate realiza colorația vitală de contrast, cu roșu neutru, eozină etc., care nu alterează morfologia și mobilitatea parazitului.

Parazitul se prezintă sub formă de pară, cu mișcări vii sacadate, are 3—4 flageli la extremitatea voluminoasă și este înconjurat de o membrană ondulată. Frotiul trebuie făcut într-un strat subțire, după care se usucă lent la temperatura camerei.

Parazitul colorat prin metoda Giemsa se prezintă astfel: protoplasma în albastru-deschis, iar nucleul, complexul blefaroplastic, membrana ondulată și flagelii în roșu violet.

Examenul prin culturi pe medii selective. Obişnuit, se foloseşte mediul *Löffler cu streptomycină*.

Controlul culturii se face la 48 h și 72 h de la însămînțare. Se agită bine tubul și apoi, cu ajutorul unei pipete Pasteur, se recoltează 1—2 picături, care sînt așezate între lamă și lamelă și examinate imediat la microscop. Paraziții sînt ușor de evidențiat prin caracteristicile și marea lor mobilitate.

11.5. CANDIDOZA

Micozele vulvovaginale au devenit mai frecvente, apariția lor fiind favorizată atît de tratamentul cu antibiotice, corticoizi, citostatice etc., cît și de unele stări fiziologice (sarcină) sau patologice (diabet). Produsul patologic este reprezentat de o secreție consistentă și albicioasă.

Recoltarea produsului patologic se face, de preferință, în perioada premenstruală, când fungii proliferază activ. Se prelevează cu ansa, sonda metalică sau pipeta Pasteur secreție vaginală sau grunji cazeoși caracteristici de pe pereții laterali și anteriori ai vaginului și nu din fundul de sac posterior.

Examenul preparatului fixat colorat. După fixarea preparatului se colorează cu Gram, Giemsa sau albastru de metilen. În candidoze, aspectul frotiului vaginal colorat Gram este caracteristic: pseudo-filamentele și levurile apar intens Gram-pozitive, predomină flora alcătuită din bacili și coci Gram-pozitivi, fiind săracă sau absentă flora Gram-negativă.

Medii de cultură

Mediul 2 lichid (mediu lichid de tip Sabouraud), produs de Institutul Cantacuzino, conține peptonă, glucoză, apă distilată, la un pH de 5,8—6,2.

Pentru punerea în evidență a fungilor, se însămânțează într-un tub cu 10 ml mediu o ansă din prelevatele patologice, dacă produsul este consistent, sau 0,1 ml, dacă produsul este lichid. Incubarea tuburilor însămânțate se face la 24—28°C, timp de 10 zile.

Mediul 2 solid, produs de Institutul Cantacuzino, conține peptonă, glucoză, agar.

Pentru izolarea fungilor se recomandă ca, în momentul repartizării în mediul topit și răcit la 50—55°C, să se adauge inhibitori selectivi (Penicilină 20 UI/ml și Streptomycină 0,4 g/ml, Cloramfenicol 0,5 mg/ml). Însămânțarea se face cu ansa sau cu tamponul.

Examenul prin culturi. Produsul recoltat se însămânțează pe mediul Sabouraud. Culturile se incubează 72—96 ore la temperatura camerei sau, când este necesar un rezultat rapid, 20—36 ore la 37°C.

Coloniile de *Candida albicans* (fig. 8) pe mediu Sabouraud solid pot avea aspect alb-cremos, lucios, cu creștere rapidă.

Pe mediul Sabouraud lichid culturile de *Candida* pot avea forma de vâl aerat, sediment, vâl membranos sau inel.

Aspectele macroscopice ale culturii și cele microscopice permit identificarea genului de ciupercă.

Dintre metodele folosite pentru testarea patogenității, menționăm metoda de filamentare rapidă în ser. După incubare 2—4 ore la 37°C în ser proaspăt uman, de cal, bou sau iepure, levurile de *C. albicans* patogene germinează formînd pseudo-filamente tubulare.



Fig. 8. Clamido-spori de *Candida albicans*.

Tabel recapitulativ :

I. Prelevare	↗	la bărbat — dimineata, înainte de micțiune	
	↘	la femeie — în primele 10 zile după ciclul menstrual 3 tampoane	<div> <div>→ glande Bartolin</div> <div>→ colul uterin</div> <div>→ meatul urinar</div> </div>
— transport : maximum 1 oră (excepție gonococ — însămânțare imediată)			
II. Examen bacteriologic	→ a) microscopic	<div> <div>→ preparat vital (lamă-lamelă)</div> <div>— Trichomonas (eventual ex. citologic)</div> <div>Gram — floră bacteriană</div> </div>	
		→ frotiuri	<div> <div>↗</div> <div>↘</div> </div> <div> <div>albastru de metilen —</div> <div>ex. citologic</div> </div>
Ziua 1	→ b) culturi	<div> <div>→ geloză-sînge, metoda Mueller-Hinton și selectivă</div> <div>→ AABTL</div> <div>→ Sabouraud</div> <div>→ bulion nr. 1</div> </div>	<div> <div>→ incubare în CO₂ 5—10 % ; 24—48 de ore</div> <div>→ incubare 48—72 de ore</div> <div>→ trecere pe aceleași medii</div> </div>
Ziua a 2-a	a) Repicare — identificare caractere	<div> <div>→ morfologice</div> <div>→ culturale</div> <div>→ biochimice</div> </div>	<div> <div>corelat cu aspectul bacterioscopic al frotiului</div> <div>direct</div> </div>
	b) Antibigramă		

Secreția vaginală și uretrală (după dr. V. Rusu)

Tema 12

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL MATERIILOR FECAL

Flora microbiană prezentă în materiile fecale este foarte complexă. Ea variază mult în funcție de vîrstă și alimentație. Speciile bacteriene patogene pentru aparatul digestiv sînt, de asemenea, numeroase. În plus, chiar și unii germeni care populează intestinul omului sănătos, cum sînt b. proteus, b. piocianic, stafilococul și alții pot produce afecțiuni grave în anumite situații, în care se modifică echilibrul biologic al florei bacteriene normale.

Izolarea și identificarea unui agent etiologic existent în materiile fecale sînt posibile prin efectuarea unor coproculturi sistematice. Acestea trebuie repetate după vindecarea clinică a bolnavului, pentru

a depista la timp un eventual purtător de germeni. Materiile fecale sînt recoltate în recipiente speciale numite **coprocultoare** (coprorecoltoare — fig. 9).

Coproculturile sînt obligatorii în diagnosticul: holerei, salmonelilor, dizenteriei bacilare, enterocolitelor provocate de bacilul coli, tuberculozei intestinale etc.

12.1. HOLERA

Cu toate că la noi boala nu a mai fost semnalată de mult timp, avînd în vedere gravitatea și rapiditatea cu care epidemia se poate extinde, diagnosticul holerei, în care examenul de laborator are un rol decisiv, trebuie făcut cu maximă urgență. În laboratoarele care stabilesc acest diagnostic se iau măsuri excepționale pentru evitarea contaminării personalului și pentru a împiedica orice posibilitate de răspîndire a germenului în afara ariei de lucru. Aceleași măsuri severe se iau și la recoltarea și transportul produselor patologice.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea și identificarea vibriunii holerice la bolnavi, contacți și purtători, iar în caz de epidemie, de la cadavre, din apa și alimentele contaminate.

Recoltarea produselor patologice (materii fecale, vomismente, conținutul intestinal sau al veziculei biliare la cadavre, alimentele și apa infectată) se face în recoltoare speciale din material plastic, care nu sînt utilizate decît o singură dată. Pentru fiecare probă se întocmește o fișă cu numele și adresa persoanei, data și ora recoltării, diagnosticul clinic, tratamentul efectuat înainte de recoltare etc. Cînd recoltarea a fost făcută după începerea tratamentului, coprocultura se va repeta la 24 și 48 h după încetarea administrării de medicamente antibacteriene.

La bolnavi se recoltează vomismentele și scaunele emise spontan, iar la purtătorii sănătoși și convalescenți (după cel puțin 2—3 zile de la vindecare) după administrarea unui purgativ salin. Cu ajutorul linguriței recoltorului se iau 1 g de materii fecale sau 1—2 ml din scaunul lichid și se introduc în mediul de transport și conservare Carry-Blair din coprorecoltor.

De la bolnav recoltarea se poate face și cu o sondă Nelaton sterilă, care este introdusă în rect 20—25 cm și, după manevra de sifonare, se descarcă produsul în mediul de conservare sau direct într-un mediu de îmbogățire, de exemplu, apa peptonată 1% alcalină (pH 9).

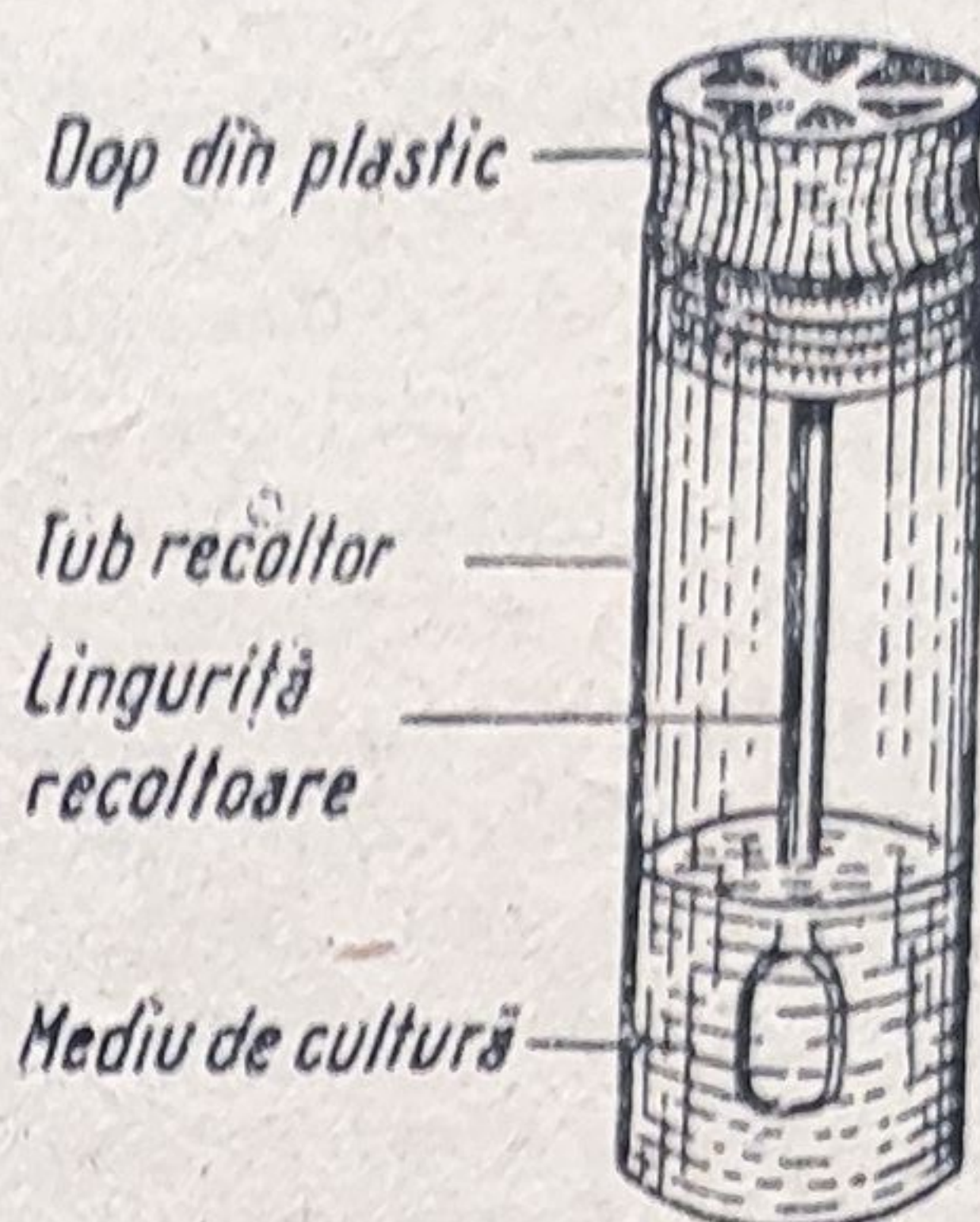


Fig. 9. Coprocultor.

Examenul microscopic direct este posibil cînd în produs există un număr mare de vibrioni și el se poate face cu imersie pe frotiuri colorate după metoda Gram, cu fucsină diluată 1/10 sau prin examinarea pe fond întunecat a unui preparat proaspăt (o picătură din scaun diareic sau vâl de la suprafața mediului de îmbogățire) între lamă și lamelă. În acest din urmă caz se pun în evidență mișcările foarte vii ale vibriunilor holerici. Cînd aceștia există, pentru precizarea diagnosticului se fac în continuare patru preparate proaspete pentru testul de imobilizare: 1 — o picătură din materialul de testat + o picătură din serul aglutinat bivalent anti-Inaba și anti-Ogawa; 2 — o picătură din materialul de testat + o picătură din serul aglutinant adsorbit anti-Inaba; 3 — o picătură din materialul de testat + o picătură din serul aglutinant adsorbit anti-Ogawa; 4 — o picătură din materialul de testat + o picătură de ser fiziologic (mar-tor). Serurile nu trebuie să conțină substanțe prezervante.

Tot pentru un diagnostic foarte rapid se poate recurge și la **testul de imunofluorescență**, care poate permite depistarea vibri-
onului holerice direct în produsele patologice sau în mediul de îmbogățire. Rezultatele sînt însă numai orientative, din cauza reacțiilor fals pozitive produse de existența, la unele enterobacterii, a unor fracțiuni antigenice comune cu vibriionul holerice.

Pentru **cultivarea vibriionului holerice**, produsele patologice ca atare, sau din mediul Carry-Blair, sînt însămînțate cu ansa sau direct cu lingurița recoltorului pentru îmbogățire, în tuburi cu apă peptonată alcalină, după ce, în prealabil, au fost omogenizate. După 5—6 h de incubare la 37°C se cercetează vâlul format sau, în lipsa acestuia, cultura de la suprafață, la microscopul cu fond întunecat, inclusiv aplicarea testului de imobilitate, pentru decelarea vibri-
onilor holerici. Totodată, se fac treceri pe un tub cu apă peptonată alcalină pentru o nouă îmbogățire și dispersii pe plăci Pétri cu medii solide: geloză nutritivă și medii selective, cu mediul BSA (agar cu săruri biliare) și mediul T.C.B.S. (tiosulfat, citrat, bilă, sucroză).

Pe plăcile cu geloză sau cu mediul BSA, primele colonii apar după 10—12 ore de incubare la termostat; ele sînt transparente și clare, spre deosebire de coloniile dense și opace formate de alți germeni. Examinarea se face și după 18—24 h.

În mediul TCBS, examinarea se face după 18—24 h de menținere la termostat. Coloniile formate de vibrionii holerici sînt netede, ușor convexe, cu centrul opac și marginile transparente, de culoare galbenă-portocalie, cu o zonă galbenă în jur.

Identificarea serologică se face la început pe colonii suspecte de pe geloză sau de pe mediul BSA și, ulterior, pentru confirmare, pe culturile repicate pe geloză înclinată sau pe mediul politrop TSI. În

acest din urmă caz sînt menținute numai tuburile care prezintă acidifierea (îngălbenirea) fără gaz a mediului solidificat, în poziție dreaptă și alcalinizarea (înroșirea) mediului solidificat, în poziție înclinată. Aglutinarea pe lamă se face cu ser antiholeric bivalent (Inaba și Ogawa), subgrup 0—1, în paralel cu un martor cu ser fiziologic tamponat și, în continuare, cu seruri aglutinante monovalente absorbite Inaba și Ogawa.

Testul oxidazei, care la vibriionul holerice este pozitiv, se execută prin punerea a 1—2 picături de reactivi (clorhidrat de tetrametil-parafenilendiamină 0,5—1% în apă distilată) peste colonia suspectă, urmărindu-se schimbarea culorii (reacția pozitivă) de la albastru-închis la negru. În continuare, se cercetează producerea de Indol și H_2S , reacțiile roșu de metil și Voges-Proskauer, fermentarea zaharurilor și prezența unor enzime.

12.2. SALMONELOZE

Coprocultura. Recoltarea materiilor fecale de la bolnavi se face de către personalul sanitar al spitalului. Într-un vas smălțuit, spălat bine și opărit cu apă fiartă înainte de utilizare, se recoltează aproximativ 4—5 g materii fecale introduse cu spatula într-un recoltor steril. Dacă scaunul este lichid (diareic), se recoltează în această stare; dacă este mai consistent, se omogenizează cu puțin ser fiziologic; dacă bolnavul este constipat, produsul se recoltează după o clismă cu apă fiartă și răcită.

Foștilor bolnavi de febră tifoidă și contactilor li se administrează o doză mică de sulfat de sodiu și sulfat de magneziu, în părți egale (cîte 15 g), dizolvate în 200—250 ml apă, după care se procedează la recoltarea materiilor fecale, trei zile consecutiv.

După efectuarea recoltării vasele folosite sînt umplute cu o soluție de clorură de var 10%, pentru dezinfectare.

Examenul materiilor fecale pentru salmonelle trebuie făcut cît mai aproape de momentul recoltării, preferabil înainte de 6 h. În cazul cînd însămînțarea nu se poate face în acest interval de timp, este necesar ca recoltarea și transportul probelor să se facă într-un lichid conservant (de exemplu, soluție sterilă de glicerină, soluție de tetrathionat sau soluție de acid boric 0,5%). Lichidul conservant se repartizează, în mod steril, cîte 3—5 ml în recoltoare sterile. În lichidul de conservare se introduce cu spatula sau cu o ansă metalică circa 2—3 g materii fecale, care se omogenizează bine pe peretele recoltorului.

Dacă transportul materiilor fecale se poate efectua la temperatură joasă, utilizarea lichidului conservant nu mai este necesară, cu condiția să nu se depășească intervalul de 24 h de la prelevarea pro-

bei pînă la însămînțare. De la însămînțare și pînă la incubarea în termostat, la 37°C, să nu treacă mai mult de 5 h.

Recoltoarele, închise ermetic, vor fi transportate în casolete sau în pungi de plastic închise prin sudură sau prin legare după o dublă pliere. Recoltoarele purtînd numere de ordine vor fi însoțite de un label care, în dreptul numărului de ordine respectiv, va avea însemnat: numele și prenumele, vîrsta, domiciliul sau colectivitatea, motivul coproculturii (bolnav, contact, fost bolnav, purtător, control angajare sau periodic), locul și data (inclusiv ora) recoltării.

Însămînțarea materiilor fecale. Fiecare probă de materii fecale se însămînțează direct pe o placă cu *mediul Wilson-Blair* și în *mediul de îmbogățire cu selenit acid de sodiu* sau, în lipsa lui, în *mediul Müller-Kauffmann*.

Pentru însămînțarea directă se depun pe placă 4—5 picături, care se întind pe 2/3 din suprafață, rămînînd a se dispersa pe ultima treime, prin striuri apropiate, cu ansa, pentru obținerea unor eventuale colonii izolate. Se va utiliza întotdeauna și o placă martor cu *mediul Wilson-Blair*, însămînțată pe jumătate cu o picătură luată cu ansa dintr-o cultură de 24—48 h de *S. typhi*, în bulion, iar cealaltă jumătate este însămînțată identic cu o altă salmonelă din stocul laboratorului.

Paralel cu însămînțarea directă pe *mediul Wilson-Blair*, se însămînțează 0,5—1 ml din aceeași suspensie de materii fecale în 8—9 ml mediu de îmbogățire. După incubare la termostat, de 18—24 h pentru mediu selenit acid de sodiu sau 10—12 h pentru *mediul Müller-Kauffmann*, se face trecerea pe mediile selective. Din *mediul* cu selenit se recomandă a se face trecerea pe *mediul Leifson* preparat de Institutul Cantacuzino sau, în lipsa acestuia, pe *mediul* cu bilă uscată Istrati-Meitert.

De pe *mediul Müller-Kauffmann* trecerea se face, în mod obligatoriu, pe *mediul Wilson-Blair*.

Pe *mediul Leifson* (sau ADCL), după incubare timp de 24 h la 37°C, coloniile de *Salmonella* apar transparente, de culoare roz-gălbui, ca și alte bacterii lactozo-negative. Germenii care produc H₂S (*Proteus*, *Salmonella*) pot prezenta, după 24 sau 48 h, colonii cu centrul negricios. Germenii lactozo-pozitivi (*Escherichia* și *Klebsiella*) sînt, în general, inhibați, dar se pot dezvolta sub forma unor colonii roșii, lipsite de transparență, cu o zonă de opacifiere a mediului în jurul coloniei.

În cazul folosirii mediului cu bilă uscată, salmonellele dezvoltă colonii verzi-albăstrui, ce pot fi ușor deosebite de coloniile de *E. coli*, care sînt de culoare galbenă. Însămînțările efectuate pe *mediul Wilson-Blair* sînt examinate după incubare timp de 48 h la 37°C.

Germenii din genul *Salmonella* dezvoltă fie colonii negre, de 1—2 mm diametru, turtite, aderente la mediu, cu luciu și halo metalic, fie colonii mici, de culoare verde-albăstruie.

Coloniile suspecte de pe mediul Wilson-Blair, de pe mediul Leifson sau mediul cu bilă uscată trebuie trecute pe un mediu diferențial: *geloză lactozată cu albastru de bromtimol* sau *mediul TSI*.

— În cazul utilizării gelozei lactozate cu albastru de bromtimol se va adăuga 1% tiosulfat de sodiu, pentru a inhiba eventualele colonii de *Proteus*.

— În cazul folosirii mediului TSI, 2—4 colonii suspecte de pe mediul Wilson-Blair sau mediul Leifson sînt trecute fiecare pe cîte un tub cu mediu diferențial.

Însămîntarea se face atît prin înțepare cu ansa în profunzimea coloanei verticale a mediului, cît și prin descărcarea ansei, în striuri, pe suprafața înclinată. După incubare timp de 18—24 h la 37°C, salmonellele fermentează glucoza (porțiunea dreaptă a mediului apărînd colorată în galben, adesea cu bule de aer care indică producerea de gaz), elaborează H_2S (înnegrind locul înțepat cu ansa în coloana dreaptă) și nu fermentează lactoza și zaharoza (porțiunea superioară înclinată a mediului rămînînd de culoare roz). De pe geloza lactozată cu albastru de bromtimol se pot face treceri pe mediile politrope 1 și 2 (produse de Institutul Cantacuzino).

După însămîntarea tulpinii în profunzime și la suprafață pe mediul politrop 1 și incubare timp de 24 h la termostat, se poate stabili capacitatea culturii de a fermenta glucoza și manita, de a produce urează. Tulpinile de *Salmonella* virează culoarea mediului de la verde la galben (datorită fermentării glucozei și manitei), cu apariția de bule de gaz, în timp ce tulpinile de *Proteus* produc o puternică colorare în albastru (în urma scindării ureei). Prin folosirea mediului politrop 2 se determină mobilitatea tulpinii, proprietatea de a fermenta zaharoza și de a produce indol și H_2S .

Datorită mobilității și lipsei de fermentare a zahărului, tulpinile de *Salmonella* tulbură mediul fără modificarea culorii (verde-albastru), banda de hîrtie indicatoare pentru H_2S înnegrindu-se mai mult sau mai puțin puternic (pe o lungime de cel puțin 1 cm), iar banda galbenă indicatoare pentru indol rămînînd neschimbată.

În afara probelor enumerate mai înainte, se vor cerceta, concomitent cu probele de identificare serologică, acele caractere morfologice și biochimice care permit încadrarea tulpinii de cercetat în genul *Salmonella*: *examenul culturii pe frotiu colorat după metoda Gram*;

cultivarea în mediu cu citrat ca unică sursă de carbon ; reacțiile roșu de metil și Voges-Proskauer, comportarea față de KCN ; urmărirea prezentei lizindecarboxilazei.

Orice salmonelă se identifică și serologic, prin cercetarea structurii antigenice.

12.3. DIZENTERIA BACILARĂ

Boala este produsă de *bacilii dizenterici*.

Diagnosticul de certitudine al dizenteriei bacteriene se bazează pe izolarea și identificarea bacililor dizenterici în fecalele bolnavilor sau purtătorilor de germeni, în alimente și apa contaminate.

Recoltarea produsului patologic se face în recipiente sterilizate prin căldură, preferabil în coprorecoltoare speciale. La bolnavii acuti se recoltează materiile fecale emise spontan, cât mai la începutul bolii și, pe cât posibil, înainte de administrarea de antibiotice sau chimioterapice. Bacilii dizenterici se găsesc în număr mare în mucus, puroi sau fragmente de mucoasă.

La bolnavii cronici și la purtători se recomandă recoltarea cu sonda Nelaton (nr. 16—18), sterilizată prin fierbere și umectată cu soluție salină fiziologică sterilă. Sonda trebuie introdusă în rect cel puțin 15—20 cm la adult și 10—15 cm la copil, pentru a se recolta materii fecale din partea superioară a rectului și din sigmoid, regiunea în care sînt localizate ulcerările caracteristice dizenteriei. Aspirarea produsului se face fie cu seringă, fie prin sifonaj. În lipsa sondei recoltarea se mai poate face și cu un tampon de vată steril, înmuiat în bulion steril sau soluție salină fiziologică sterilă, pentru a se evita senzația neplăcută sau dureroasă provocată de introducerea tamponului în rect.

Cînd este posibil, recoltarea se va face direct din leziunile recto-sigmoidiene cu ajutorul unui tampon de vată steril, utilizînd pentru aceasta un rectoscop (aparat format dintr-un tub metalic prevăzut cu un bec electric și piese anexă pentru recoltare).

După recoltare se recomandă ca înșămîntarea să se facă cât mai curînd posibil. Cînd acest lucru nu este posibil, materialul patologic recoltat trebuie introdus într-un lichid conservant, de exemplu mediul conservant glicerinat tamponat.

Transportul probelor se face, obligatoriu, în lichid conservant și la rece. Recoltoarele perfect închise trebuie să aibă numere de ordine și să fie însoțite de o fișă cu : numele și prenumele, vîrsta, adresa, motivul recoltării (bolnav acut sau cronic, purtător, contact etc.), locul și data (ora) recoltării, dacă recoltarea s-a făcut înainte sau după administrare de antibiotice.

Însămînțarea produselor patologice se face pe medii de cultură selective (mediul Leifson, mediul ADCL, mediul Istrati-Meitert) sau pe medii diferențiale (geloză lactozată cu albastru de bromtimol). Înainte de a fi însămînțat, produsul este omogenizat, iar materiile fecale cu aspect normal sînt, în prealabil, diluate 1/10 în soluție salină fiziologică. Cînd produsul conține mucozități se recomandă ca însămînțarea să se facă cu aceste fragmente de mucoasă.

Mediile selective sau diferențiale, proaspăt preparate, sînt turnate în plăci Pétri, iar însămînțarea lor se face prin dispersii cu ansa sau cu o pipetă Pasteur îndoită la vîrf. După o incubare de 18—24 h la 37°C, se repică (preferabil pe mediu cu bilă Istrati-Meitert) mai multe colonii lactozo-negative, suspecte de a fi formate din bacili dizenterici. Totodată, dacă este posibil, vor fi efectuate aglutinări pe lamă, care permit un diagnostic rapid, preliminar. După o incubare de 18—24 h la termostat, identificarea culturilor pure se face prin metode morfologice, biochimice, serologice și, eventual, biologice. Izolarea bacililor dizenterici din apă este posibilă prin filtrarea apei pe membrane sterile care, ulterior, sînt aplicate pe suprafața unor plăci Pétri cu medii selective.

12.4. ENTEROCOLITE PRODUSE DE BACILLUS COLI

Coprocultura se efectuează pe materiile fecale emise spontan sau recoltate cu sonda Nélaton. Cînd însămînțarea nu se poate face imediat, recoltoarele se păstrează la +4°C sau se folosesc lichide conservante. Produsul este însămînțat prin dispersie pe medii solide diferențiale, care conțin lactoză și un indicator de pH, cum ar fi: *mediul Drigalski*, *mediul Levin* (geloză lactozată cu eozină și albastru de metilen) sau *mediul AABTL* (geloză lactozată cu albastru de bromtimol).

De pe mediile diferențiale se iau cu ansa coloniile suspecte și se trec pe geloză nutritivă 20%, după care urmează identificarea germe-
nilor izolați în cultură pură, prin studiul caracterelor morfologice, biochimice și serologice.

12.5. TUBERCULOZA INTESTINALĂ

Cercetarea b. Koch în fecale se face după o prealabilă omogenizare a acestora și concentrarea bacililor; se triturează într-un mojar 1 g fecale cu 15 ml soluție 1% de riboflavină. Se filtrează prin tifon; la filtrat se adaugă o cantitate egală de acid sulfuric 10%. După o oră se centrifughează, se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul este reluat în soluție clorurosodică izotonică sterilă. După neutralizarea cu hidroxid de sodiu 10% în prezența unui indicator se centrifu-

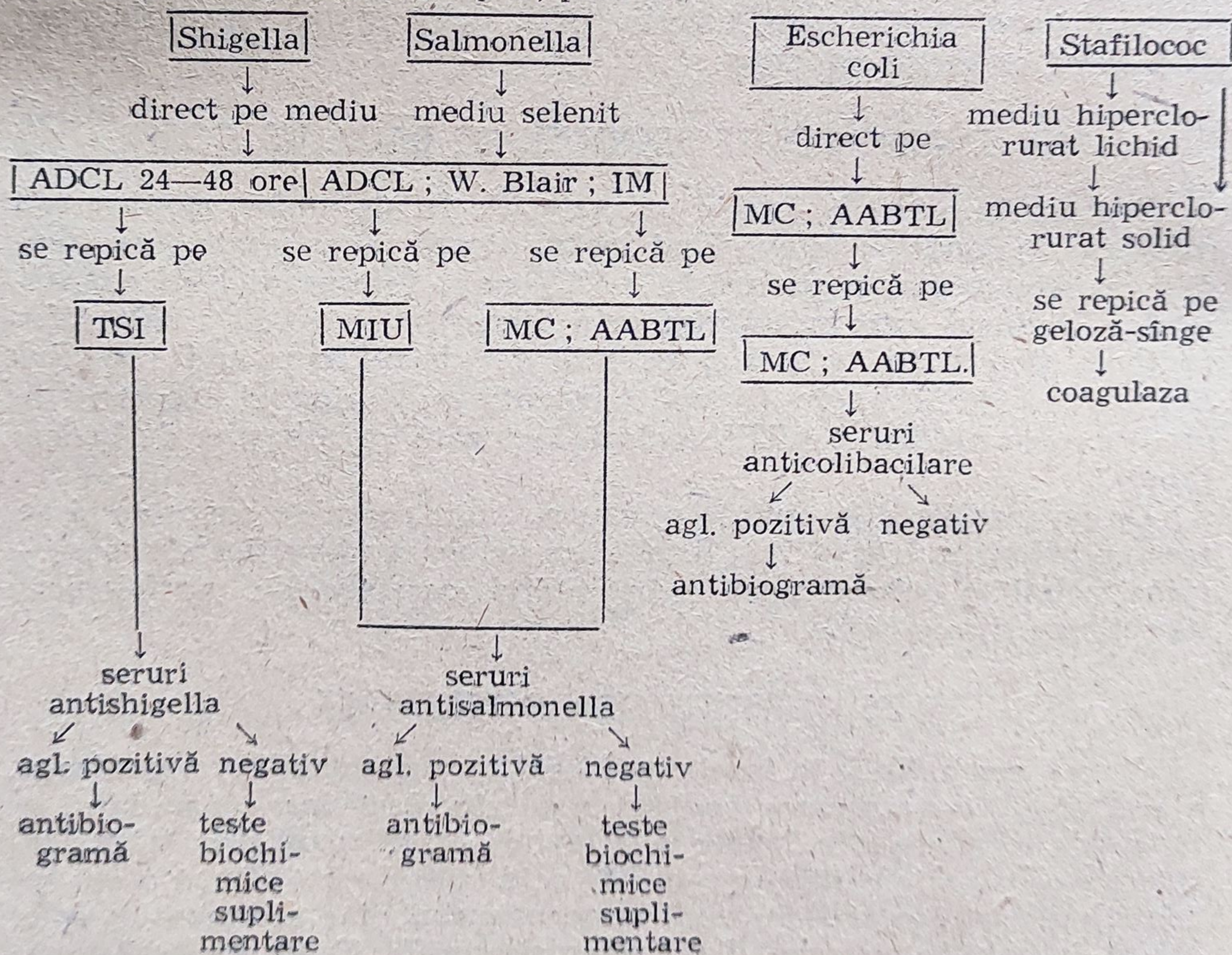
ghează din nou, iar sedimentul resuspendat în soluția clorurosodică izotonică sterilă este utilizat pentru efectuarea de frotiuri ce se colorează după metoda Ziehl-Neelson, pentru însămînțări pe mediu Lowenstein și pentru inoculări la cobai. Ulterior, se face testarea sensibilității germenului la antibiotice și chimioterapice.

Tabel recapitulativ :

I. Prelevare	→ scaun proaspăt	→ spontan	bolnav
		→ purgativ	
	→ scaun după purgativ salin	→ bolnavi cronici	coprocul- toare
		→ purtători (tific 3 zile)	
		→ persoane nespitalizate	→ sticlă
	→ cu sonda	→ Nélaton	→ plastic
		→ sticlă (la copii)	
	→ cu tampon la rectoscopie		

Transport	→ max. 2 ore de la însămînțare
	→ lichid conservant
	→ mediu Carry-Blair

Însămînțare (suspensie în SF pH7) pentru :



Coprocultura (după dr. V. Rusu)

Temă 13

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL URINEI

Germenii patogeni apar în urină la oamenii cu infecții generalizate, cum sînt : febra tifoidă, bruceloza, leptospirozele etc., sau în infecții ale căilor urinare (pielonefrită, cistite etc.) cu *b. coli*, *b. proteus*, *b. Koch* etc.

În infecțiile urinare, pe lîngă germenii patogeni, la examenul direct sînt puse în evidență în special leucocitele, care modifică aspectul normal al urinei.

Infecțiile urinare sînt favorizate atît de afecțiuni care scad rezistența generală a organismului, cît și de calculi, compresiuni tumorale, deformații anatomice etc.

Examenul bacteriologic al urinei are drept scop : izolarea și identificarea agentului patogen (examenul calitativ), determinarea concentrației germenilor — **urocultură cantitativă** și testarea sensibilității la antibiotice a microbului izolat — *antibiograma*.

Recoltarea urinei se face înainte de administrarea de antibiotice sau chimioterapice. Se recomandă bolnavului să-și facă toaleta glandului cu apă caldă și săpun și apoi să se dezinfecteze cu un tampon de vată sterilă înmuiată într-o soluție antiseptică. Primele jeturi de urină, fiind contaminate cu floră microbiană saprofită, sînt îndepărtate ; în continuare, se recoltează 20—30 ml urină în recipiente cu dop sterile (flacoane cu gît larg, borcane etc.).

La bolnavii cu retenție urinară, recoltarea se poate face prin sondaj vezical sau prin puncție suprapubiană.

Explorarea fiecărui rinichi în parte este posibilă prin recoltarea separată a urinei din fiecare ureter în cursul cistoscopiei. La copiii mici recoltarea se poate face în pungi speciale de plastic.

Urina recoltată, însoțită de un buletin în care sînt înscrise datele privind identitatea bolnavului, diagnosticul clinic prezumtiv, data și ora exactă a recoltării, tratamentul cu antibiotice aplicat anterior recoltării etc. este transportată imediat la laborator pentru examinare. Urina lăsată la temperatura laboratorului mai mult de 2 ore de la recoltare nu mai poate fi utilizată pentru examene bacteriologice corecte.

În anumite cazuri, bolnavul trebuie pregătit în mod special înainte de recoltare.

Pentru cultivarea leptospirelor, este necesară alcalinizarea urinei prin administrare de bicarbonat de sodiu. Astfel, se schimbă pH-ul obișnuit al urinei care omoară rapid leptospirele.

Examenul microscopic direct al urinei proaspăt recoltate se poate face înainte sau după centrifugare. O picătură de urină necentrifugată se lasă să se usuce pe o lamă, după care se fixează și se colorează Gram. Când pe fiecare câmp examinat cu obiectivul cu imersie apar germeni, se poate presupune, cu o mare aproximație, că urina respectivă conține peste 100 000 germeni/ml, cifră considerată ca semnificativă pentru o infecție urinară.

Urina trebuie introdusă în lucru cât mai repede posibil de la recoltare. Când acest lucru nu se face imediat, urina va fi păstrată la frigider.

Pentru **urocultura calitativă**, însămînțarea se face pe **medii solide** (geloză-sînge, geloză nutritivă simplă, medii diferențiale etc.) și pe **medii lichide** (bulion simplu, bulion glucozat 10% etc.), urmată de studii morfologice, biochimice, serologice etc.

Cînd este necesar, însămînțarea urinei se va face și pe mediu cu tioglicolat pentru anaerobi.

Rezultatele furnizate de urocultura calitativă au valoare practică, mai ales în afecțiunile generale cu eliminarea urinară a agentului patogen, cum sînt: febra tifoidă, bruceloza, leptospiroza. De asemenea, în tuberculoza urogenitală, cînd însămînțările urinei se fac pe medii speciale cum este, de exemplu, mediul Löwenstein, izolarea și identificarea b. Koch este deosebit de importantă.

Pentru **urocultura cantitativă** trebuie folosite **medii solide**. Dintre acestea, menționăm: *mediul Cled*, *mediul Mac Conkey* (geloză lactozată) sau *AABTL*.

Mediul Cled (cistină-lactoză-electrolit-deficient) conține: extract de carne 3 g, peptonă 4 g, hidrolizat triptic de cazeină 4 g, lactoză 10 g, cistină 0,128 g, albastru de bromtimol 0,02 g, geloză 15 g, apă distilată 1 000 ml, pH 7,3.

Mediile se prepară în laborator sau pot fi obținute gata preparate ca atare sau uscate sub formă de pulbere. Mediul din flaconul steril este topit prin fierbere și, după o eventuală corectare a pH-ului, este repartizat steril pe lame, în recipiente speciale, pentru depunerea mediului pe pereți sau în plăci Pétri sterile. Repartizarea se face cu pipete, acoperind 2/3 din suprafața lamelor cu mediu de cultură. Pînă la folosire (cel mult 1—2 zile), lamele cu mediu sînt păstrate la frigider. Pentru sterilitate este preferabil ca mediile să fie repartizate în recipiente speciale sau chiar în simple eprubete și sticlute, după care are loc solidificarea acestora pe pereți. În acest caz, sterilitatea și umiditatea mediilor pot fi păstrate mai multe zile. Repartizarea mediilor din plăcile Pétri se face în mod obișnuit.

Cînd mediile sînt obținute uscate sub formă de pulbere, ele se topesc în apă distilată, prin fierbere. După corectarea pH-ului mediile sînt turnate pe lame în recipiente speciale sau în cutii Pétri.

Mediile astfel rehidratate, care nu sînt utilizate imediat, sînt repartizate în flacoane și sterilizate 30 min la 110°C sau 25 min la 118°C , după care sînt păstrate pentru a fi folosite la nevoie. Repartizarea poate fi făcută și direct în recipientele „de lucru”, iar topirea și răcirea mediului pe pereți se fac în ziua utilizării.

Însămînțarea urinei se face astfel : lamele acoperite cu mediu de cultură sînt scoase din recipient și introduse în urina colectată într-un flacon steril. Urina poate, de asemenea, să fie turnată peste mediu fie din colector, fie direct din jetul urinar mijlociu. După ce se face notația corespunzătoare, lamele sînt introduse înapoi în recipientele sterile și plasate la termostat. Cînd urina este intens infectată este bine ca, în plus, să se înmoaie o lamă cu mediu de cultură și într-o probă de urină diluată 1/100.

Recipientele cu mediu repartizat pe pereți se umplu cu urină și, după un contact de 30 s, urina este îndepărtată. Se etichetează și se introduc în termostat.

Plăcile Pétri pot fi însămînțate în mai multe moduri. Pentru uroculturile calitative însămînțarea se face, în mod obișnuit, cu pipeta Pasteur sau cu ansa.

Efectuarea **uroculturilor cantitative** necesită însămînțarea unei cantități exact măsurate de urină omogenizată prin agitare. Pentru aceasta, se poate folosi fie o ansă calibrată, fie o pipetă gradată. În acest din urmă caz se picură 0,1 ml urină pe suprafața mediului, după care lichidul este dispersat pe toată suprafața cu o baghetă de sticlă. În urina puternic infectată, coloniile izolate se obțin numai dacă se însămînțează urina diluată în apă distilată 1/100.

Pentru a crește precizia metodei, se poate practica tehnica diluțiilor. Se însămînțează plăci Pétri cu medii de cultură standard cu diluții de urină 1/100, 1/10 000 și 1/1 000 000 în ser fiziologic steril.

Însămînțarea mediilor se poate face fie în suprafață prin tehnicile obișnuite, fie, cu și mai multă precizie, în plăci turnate. În acest din urmă caz se pune cîte 1 ml din fiecare diluție de urină în cîte o placă Pétri. Se toarnă apoi cîte 15 ml mediu de cultură topit și răcit la $45-50^{\circ}\text{C}$ în fiecare placă, după care se amestecă bine prin agitare. După solidificare plăcile sînt introduse, în poziție răsturnată, la termostat, la 37°C .

Pentru **calcularea concentrației germenilor** din urină se numără coloniile bacteriene apărute după o incubare de 18—24 ore la 37°C , sau la 48 ore, cînd în primele 24 ore nu au crescut germeni.

În efectuarea calculului se va ține cont de factorul de diluție al urinei, ca și de cantitatea de urină însămînțată sau, în cazul lamelor și al recipientelor speciale pentru uroculturi, de cantitățile de urină absorbită de mediul utilizat.

Un procedeu mai comod, frecvent utilizat, este *metoda ansei calibrate*, în care se folosesc două anse : una cu diametru de 5 mm, care se încarcă cu un volum de 0,01 ml și cealaltă cu diametru de 2,5 mm, care se încarcă cu 0,001 ml urină. Se ia cu fiecare ansă cantitatea respectivă de urină și se dispersează pe plăci Pétri cu mediu de cultură. După incubare se numără coloniile și rezultatul se înmulțește cu 100 și, respectiv, cu 1 000, după care se face media acestor două diluții.

În general, într-o infecție urinară numărul germenilor este de cel puțin 100 000/ml urină. Menținerea acestei concentrații la 2—3 examene repetate mărește certitudinea diagnosticului, chiar și în cazul urinei recoltate de la femei. Când numărul de germeni este între 10 000 și 100 000/ml urină, există o suspiciune de infecție urinară și urocultura trebuie repetată. Când numărul este sub 10 000/ml urină, prezența germenilor nu are semnificație clinică. Se va ține însă cont când diureza este mare sau când s-a făcut un tratament cu antibiotice sau chimioterapice, care pot diminua mult numărul de germeni din urină.

Identificarea germenilor se face pe baza caracterelor de cultură (aspectul coloniilor pe mediile de cultură), morfologice (frotiuri colorate), biochimice, serologice și, pentru unele specii, și a caracterelor de patogenitate. Infecțiile urinare sînt produse mai frecvent de germeni din familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *B. Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) sau de *b. piocianic*, streptococi, stafilococi.

Pe mediul Cled coloniile de *E. coli* sînt galbene, opace și au diametrul de 2—4 mm ; cele de *Enterobacter* și de *Klebsiella* sînt mucoase ; de *Proteus* sînt albastrii, mici (cu diametrul de 2 mm) și translucide ; de *b. piocianic* sînt verzui-albastrii ; de streptococi sînt foarte mici ; de stafilococ sînt, de asemenea, mici și pigmentate cînd aparțin speciei de stafilococ auriu, iar coloniile de *Candida* sînt ceva mai mari și au o culoare albă caracteristică.

Testarea sensibilității germenilor la antibiotice trebuie făcută separat pe fiecare specie bacteriană izolată.

Cînd infecțiile urinare sînt provocate de anumite specii bacteriene (*E. coli*, *B. proteus*) se pot face determinări de sensibilitate la bacteriofagi în vederea completării tratamentului.

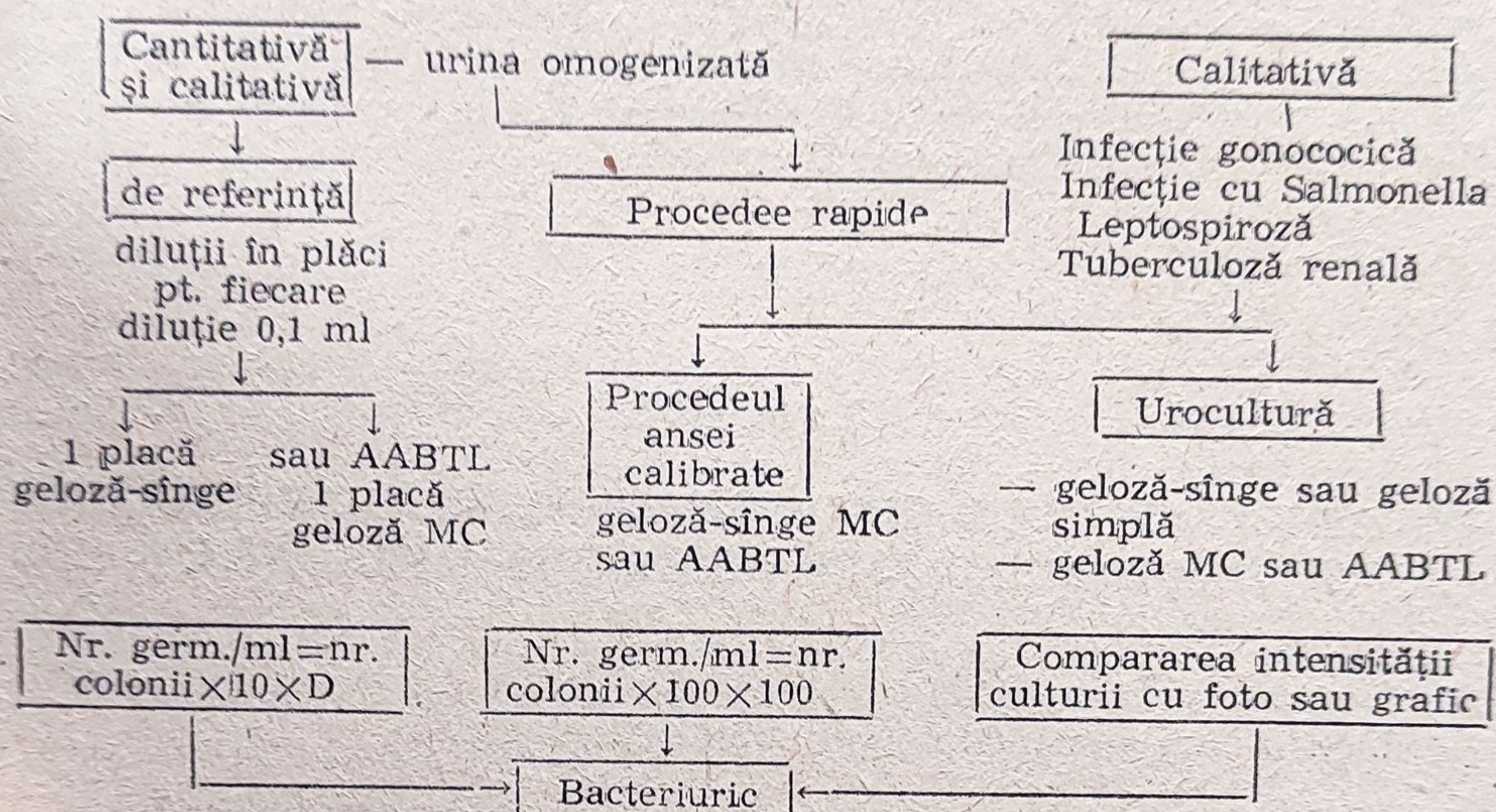
Pentru a stabili eficiența tratamentului aplicat, este necesar să se facă uroculturi de control repetate.

De asemenea, prin examene medicale complementare (radiografii, testări biochimice etc.), este bine ca să se stabilească cauzele care au favorizat apariția infecției urinare, pentru ca prin îndepărtarea acestora să se poată ajunge la o vindecare definitivă.

Tabel recapitulativ

I. Prelevare : efectuată din jetul mijlociu ; recoltări multiple la 24 de ore interval ; uneori, recoltare prin puncție suprapubiană. Transport în maximum 1 oră sau păstrare la $+4^{\circ}\text{C}$.

II. Examinare

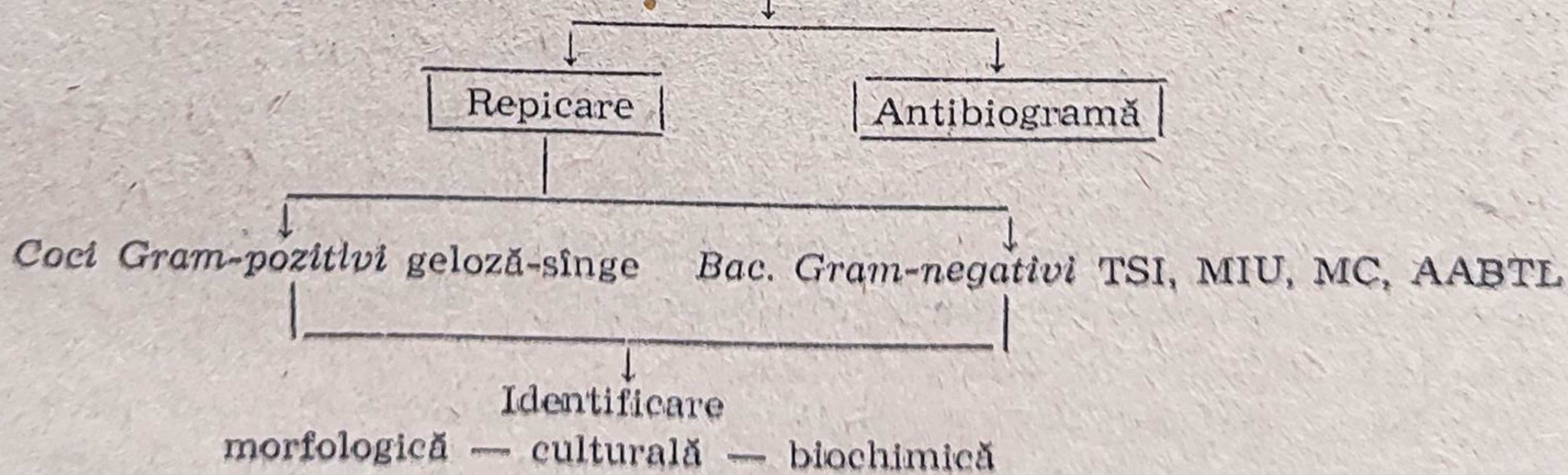


sub 1 000 germ./ml = contaminare

1 000—10 000 germ./ml = fiziologic nesemnificativ

10 000—100 000 germ./ml = suspiciune de infecție urinară
(se repetă)

peste 100 000 germ./ml = semnificativă



Urocultura (după dr. V. Rusu)

În tuberculoza renală, pentru efectuarea uroculturilor se va recolta urina de dimineață în două baloane sterile (de 250 ml, cu gît larg), două zile consecutiv (primul balon se va păstra la $+4^{\circ}\text{C}$ pînă a doua zi, la recoltarea celui de-al doilea produs). Urina se va recolta fără sondă, dar după o toaletă riguroasă a meatului urinar. Cu o zi înainte de recoltare se va indica bolnavului reducerea cantității de lichide și se va suspenda administrarea de medicamente. În cazul administrării de tuberculostatice este indicat ca recoltarea să se efectueze numai după o întrerupere de 5—7 zile a tratamentului respectiv. Este necesară centrifugarea urinei (15 min la 3 000 t/min), în vederea concentrării germenilor. Sedimentul obținut este tratat prin tehnica omogenizării și centrifugării, după care se fac însămînțări pe mediul Löwenstein sau pe alte medii adecvate și inoculări la cobai. În toate cazurile se testează sensibilitatea b. Koch la antibiotice și chimioterapice, în vederea administrării unui tratament adecvat.

Tema 14

EXAMENUL LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN, AL SUCULUI GASTRIC ȘI DUODENAL, AL EXSUDATELOR ȘI TRANSSUDATELOR

Lichidul cefalorahidian suferă modificări în urma pătrunderii germenilor sau virusurilor la nivelul piei-mater.

14.1. RECOLTAREA LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN

Lichidul cefalorahidian (L.C.R.) se recoltează în condiții de perfectă asepsie pe cale lombară (între L_4 — L_6), în eprubete sterile, cantitatea fiind de 10—15 ml. Bolnavul este așezat, de obicei, pe scaun cu brațele aduse în față pe lîngă corp, capul fiind bine flectat, cu bărbia în piept. Locul reperat și dezinfectat cu iod este punctat cu un ac lung cu bisoul scurt, prevăzut cu mandren. Se scoate mandrenul, se recoltează lichidul, se tamponează locul cu iod și bolnavul se întinde orizontal fără pernă. Produsul recoltat se va trimite imediat la laborator; în cazul cercetării meningococului, lichidul recoltat trebuie ferit de lumină și ținut la 37°C .

Normal, lichidul este limpede și nu coagulează în timp. Acest aspect poate fi modificat. Poate fi *hemoragic*: accidental, prin înțeparea unui vas în timpul puncției sau *patologic*: în hemoragii cere-

brale, meningeae etc. Diferențierea celor două situații se face centrifugând lichidul. În prima situație supernatantul va fi un lichid incolor, iar în cea de a doua el va fi colorat în roșu.

Lichidul mai poate fi ca serul sanguin — xantocromin — sau tulbure, de la ușor opalescent pînă la purulent.

Determinarea cantitativă constă în a stabili numărul elementelor celulare pe mm^3 . Numărătoarea se face pe celule speciale (Nageotte sau Fuchs-Rosenthal). În mod normal, în L.C.R. se găsesc între 1—5 elemente pe mm^3 . Cifrele superioare sînt socotite patologice. Problema devine mai complicată cînd lichidul conține hematii; ele trebuie distruse cu o picătură de acid acetic glacial. La calcul vor fi scăzute leucocitele aflate în lichid și a căror proveniență este sîngele.

Determinarea calitativă. În L.C.R. se găsesc în mod normal celule mononucleare mici, de mărimea limfocitului din sînge și, uneori, celule arahno-endoteliale, mononucleare mari, rotunde sau ușor poligonale, cu protoplasma bogată și nucleul mic. În cazurile patologice pot fi întîlnite toate elementele din sînge. Evidențierea acestora se face pe preparate subțiri, colorate May-Grünwald-Giemsa, efectuate din sedimentul centrifugat 20 min la 3 000 ture a unei cantități de lichid. Din cauza receptivității crescute a celulelor L.C.R. pentru coloranți, fixarea nu va depăși 15 s, iar colorarea 20 s, colorantul făcîndu-se cu 4 picături la 10 ml apă distilată.

În cadrul examenului chimic se pot face :

- dozarea proteinelor totale prin metoda Sicard, prin precipitarea la cald cu acid tricloracetic 33% ; valorile normale sînt 10—30 $\text{mg}\%$;
- dozarea glucozei : valoarea medie normală este de 60 $\text{mg}\%$;
- dozarea clorurilor : normal, 700—750 $\text{mg}\%$ și a ureei : normal, 14 $\text{mg}\%$.

Cu ajutorul *reacției Pandy* se pun în evidență serumalbuminele în prezența unei soluții saturate de acid carbolic, iar cu *reacția Nonne-Apelt* globulinele care precipită într-o soluție de sulfat de amoniu.

În cadrul examenului serologic al lichidului cefalorahidian se pot face *reacția Bordet-Wassermann* și *reacția benzoe-coloidal*. La efectuarea *reacției Wassermann* lichidul nu trebuie inactivat. Lichidele ce conțin sînge vor fi însă centrifugate și inactivate. Reacția se face după cel puțin 12 ore de la recoltare, pentru a înlătura reacțiile pozitive nespecifice.

Examenul bacteriologic. Microbii cei mai frecvenți întîlniți în meningite sînt *meningococul* și *b. Koch*, după care urmează : *stafilococul*, *pneumococul*, *streptococul*, *cocobacilul Pfeiffer*, *colibacilul*. Lichidul va fi însămînțat cît mai repede pe plăci cu geloză-sînge,

geloză sînge chocolat, mediul Müller-Hinton, tuburi cu bulion tioglicolic, cu bulion Tiem, mediul Löwenstein și Sabouraud, primele încălzite în prealabil. Se vor confecționa frotiuri ce vor fi colorate Gram și Ziehl-Neelsen. Acestea vor fi examinate cu deosebită atenție, întrucît informațiile furnizate și transmise clinicianului pot duce la aplicarea unui tratament adecvat în timp scurt.

Frotiul poate evidenția : diplococi Gram-negativi, intra- și extracelulari = meningococi ; coci lanceolați, Gram-pozitivi, dispuși în diplo-, frecvent capsulați = pneumococi ; coci Gram-pozitivi în grămezi = stafilococi ; coci Gram-pozitivi în lanțuri = streptococi ; bacili Gram-negativi, polimorfi, de la forme cocobacilare la forme filamentoase, adeseori intracelulari = *Haemophilus influenzae* ; bacili Gram-pozitivi, în grămezi sau perechi, colorați inegal, cu aspect diftermorf = *Listeria monocytogenes*.

Dacă frotiul nu pune în evidență germeni și, totuși, informațiile pledează pentru o meningită meningococică, atunci efectuarea unei reacții de precipitare Vincent-Bellot lămurește etiologia.

Mediile însămîntate vor fi examinate după 24 h, iar în cazul în care sînt negative, zilnic, timp de 5 zile.

Meningococul dă colonii mici, de 1 mm diametru, rotunde, convexe, cu marginile regulate, sclipitoare, translucide, albicioase.

14.2. EXAMENUL SUCULUI GASTRIC

Recoltarea se face, de preferat, dimineata, pe nemîncate, după o prealabilă gargară cu apă oxigenată. Sonda Einhorn, umezită cu apă sterilă, se introduce pînă în fundul gurii și, în timp ce bolnavul înghite, ea este împinsă ușor pînă ce diviziunea 50—55 ajunge în dreptul arcadei dentare. Cu ajutorul unei seringi se aspiră suc gastric.

La persoanele sănătoase stomacul nu conține nici un fel de germeni, pentru că cei introduși cu alimentele sînt distruși de aciditatea sucului gastric și de enzimele digestive. În situații anormale : stenoză pilorică, gastrită, cancer gastric etc., datorită stagnării alimentelor sau modificării acidității, se dezvoltă o gamă largă de bacterii ce pot fi puse în evidență pe frotiuri făcute din sedimentul unui centrifugat. În funcție de informațiile căpătate se fac, ulterior, însămîntări.

Elementele de citologie interesează atît prin număr, cît și prin varietate. Pentru numărătoare se folosește celula Fuchs-Rosenthal, suc gastric fiind diluat 1/10 cu ser fiziologic. Normal, se evidențiază pînă la 300 celule pe mm^3 reprezentate de celule epiteliale pavimentose și cilindrice ale mucoasei gastrice, rare leucocite.

14.3. EXAMENUL LICHIDULUI DUODENAL

Recoltarea se face dimineața, pe nemîncate, sonda fiind introdusă pînă la reperul 75. Primul eșantion aspirat cu sonda se aruncă. În mod normal lichidul duodenal este clar, galben-auriu, vîscos, prezentînd reacție alcalină.

Pentru obținerea bilei B — bilă veziculară — se introduce prin sondă 30 ml soluție sulfat de magneziu 30%, încălzit la 37°C. Această bilă are o culoare închisă, castanie, cu aspect vîscos. Fiecare probă va fi transportată imediat la laborator într-un vas cu apă caldă. În mod normal, lichidul este steril și conține puține elemente celulare. Situația se schimbă în procesele inflamatorii, cînd putem întîlni germeni din diferite specii și cînd și citologia este modificată. În preparatele examinate se văd celule epiteliale cilindrice, pigmentate, de descuamare veziculară, polinucleare, numărul lor variînd în funcție de intensitatea procesului inflamator, cristale de colesterol și bilirubinat de calciu.

Din punct de vedere parazitologic, în special în bila B, se cercetează forma vegetativă a giardiei. În chistul hidratic hepatic se pot evidenția cîrlige de *Taenia echinococcus*, iar în fascioloză ouă de *Fasciola hepatica*.

În lichidul duodenal se pot găsi și larve de *Strongiloides stercoralis*.

14.4. EXAMENUL EXSUDATELOR ȘI TRANSSUDATELOR

Exsudatele sînt lichide de natură inflamatorie. Ele pot fi: seroase, sero-purulente, lactescente, hemoragice. Se caracterizează printr-o densitate peste 1018 și printr-o cantitate de proteine peste 3%.

Transsudatele sînt lichide de origine mecanică, ca o consecință a unor tulburări în circulația locală sau generală.

Exsudatele și transsudatele întîlnite în activitatea laboratorului sînt: lichidul pleural, lichidul de ascită, lichidul articular, pericardic etc.

Recoltarea trebuie făcută în condiții de sterilitate. Pentru a împiedica coagularea fibrinei, care sechestrează în rețeaua ce o formează majoritatea elementelor celulare, recoltarea se face cu o seringă care a fost umectată în prealabil cu heparină. Din sedimentul centrifugat în eprubete sterile se fac frotiuri care se colorează May-Grünwald-Giemsa, Gram și Ziehl-Neelsen. În funcție de informațiile acestora se fac însămînțări pe o gamă variată de medii de cultură, inclusiv Löwenstein.

La efectuarea reacției *Rivalta*, solicitată în toate situațiile, amintim câteva elemente de care se va ține obligatoriu seama. În primul rând reacția nu se poate efectua în lichidele tulburi sau alburii. Raportul dintre apa distilată și acidul acetic glacial trebuie respectat (o picătură la 100 ml), deoarece cantități mai mari de acid măresc sensibilitatea reacției, făcînd-o capabilă să deceleze cantitățile mai mici de proteine.

Tema 15

EXAMENUL BACTERIOLOGIC ȘI PARAZITOLOGIC AL SÎNGELUI

15.1. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SÎNGELUI

În infecțiile generalizate bacteriile patogene produc o stare septicemică cu ridicarea rapidă a temperaturii, frisoane, alterarea stării generale și evoluție clinică gravă. În astfel de situații examenul microbiologic al sîngelui devine indispensabil. Cînd pătrunderea germenilor în sînge este trecătoare, cum se întîmplă la unele persoane cu o rezistență scăzută la infecții (diabet, ciroză hepatică, iradienți etc.), bacteriemia nu este însoțită de fenomene clinice evidente și poate trece neobservată.

Starea septicemică are cel mai adesea una din următoarele cauze :

— boli infecțioase, în care agentul patogen apare în mod constant în sînge : febra tifoparatifoidă, bruceloza etc. ;

— complicații ale unor infecții primare localizate : pneumonii, abcese, furunculoze, meningite, endocardite etc. ;

— introducerea germenilor în circuitul sanguin în cursul unor intervenții chirurgicale : chiuretaje, amigdalectomii, extracții dentare etc.

Existența unei septicemii impune, de urgență, investigația bacteriologică a sîngelui, care permite izolarea, identificarea și testarea sensibilității la antibiotice a agentului microbial pentru aplicarea unui tratament adecvat și cît mai precoce.

În aceste scopuri, se recurge la următoarele metode :

1. examenul microscopic direct al sîngelui ;
2. hemocultura ;
3. inocularea sîngelui la animale de laborator.

1. **Examenul microscopic direct al sîngelui** recoltat din pulpa degetului poate da rezultate pozitive cînd concentrația în germeni este suficient de mare (peste 10 000 germeni/ml sînge).

a. *Examenul microscopic al sîngelui proaspăt sau al plasmei pe fond întunecat* este posibil în prima săptămîină de boală în febra recurentă, leptospiroze, septicemie carbunoasă ; oferă informații rapide, dar rezultatele pozitive sînt rare.

b. *Examenul frotiurilor de sînge* se face cu obiectivul cu imersie după fixare și colorare, după metoda May-Grünwald-Giemsa sau cu fucsină fenicată 10%.

2. **Hemocultura** este metoda cea mai importantă și cea mai utilizată în examenul bacteriologic al sîngelui. Această metodă constă din însămînțarea sîngelui pe medii de cultură artificiale, în vederea izolării și identificării agentului cauzal.

a. *Recoltarea sîngelui pentru hemocultură* se face, de regulă, prin puncție venoasă, dar sîngele poate fi obținut și prin puncție arterială sau chiar din măduva osoasă (medulocultura), mai ales cînd hemocultura din sîngele venos rămîne sterilă.

Momentul cel mai potrivit pentru recoltare este cu aproximativ o oră înainte de apariția frisonului sau a creșterii temperaturii, deoarece atunci numărul de germeni în sînge este maxim.

În unele boli infecțioase cu bacteriemie obligatorie (febră tifoidă, bruceloză), șansele cele mai mari de obținere a unor rezultate pozitive sînt în primele 7—14 zile de la debut.

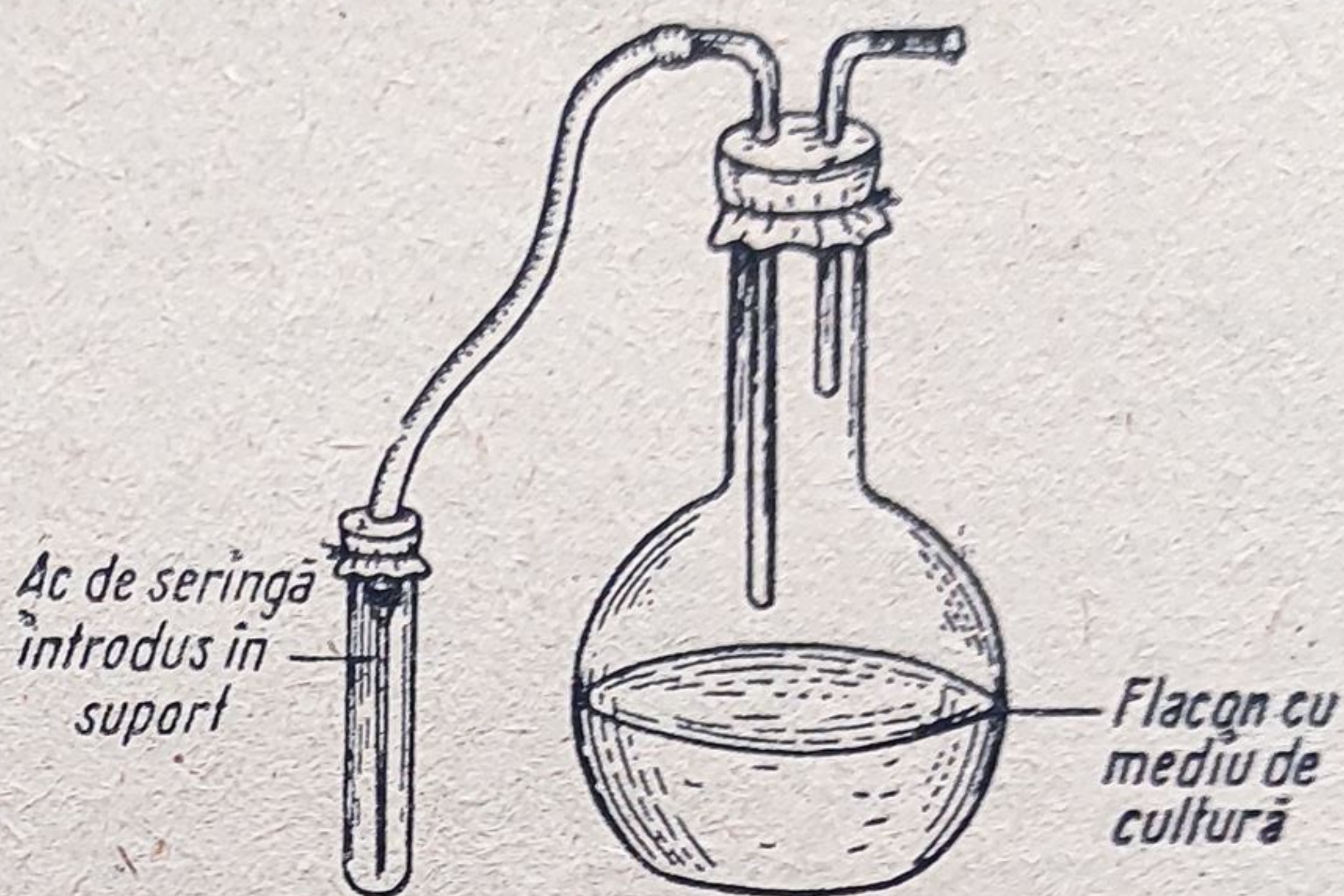
De asemenea, hemoculturile trebuie făcute înainte de a se începe tratamentul cu antibiotice sau, dacă acest lucru nu a fost posibil, recoltarea sîngelui se face înainte de administrarea unei noi doze de antibiotice. La nevoie, se va neutraliza acțiunea inhibitoare a medicamentelor administrate prin introducerea unor substanțe în mediile de cultură : acid paraaminobenzoic 1/100 000 împotriva sulfamidelor, penicilinază 1/100 împotriva penicilinei, cisteină 5—6 mg pentru a neutraliza 100 mg streptomycină și sulfat de magneziu 100 mg pentru 1 ml de sînge.

Adăugarea de polianetol sulfonat de sodiu în concentrație de 0,025% are un efect anticoagulant, antifagocitar și inhibitor al unor

Fig. 10. Seringă Luer pentru recoltare de sînge.



Fig. 11. Set de transfer pentru hemocultură.



antibiotice. Activitatea acțiunii bactericide naturale a sîngelui și chiar a medicamentelor antimicrobiene se realizează, în general, în mod satisfăcător, prin simpla diluție a sîngelui în mediu de cultură, într-o proporție minimă de 10%.

Recoltarea sîngelui, aproximativ 10—20 ml, se face în mod curent din vena plicii cotului, după o prealabilă antiseptizare a regiunii cu alcool sau cu tinctură de iod. În acest scop se folosește fie o seringă, preferabil de tip Luer (fig. 10) de 10—20 ml, fie un set de transfer adaptat la un balon cu mediu de cultură (fig. 11).

În acest din urmă caz se realizează hemocultura în circuit închis cu însămînțarea directă și imediată, care evită contaminarea produsului cu germeni nepatogeni din aer sau de pe tegumente.

Toate materialele utilizate pentru hemoculturi trebuie să fie perfect sterile, iar tehnica de recoltare și însămînțare a sîngelui trebuie executată cu o deosebită grijă, pentru a se evita suprainfectarea.

b. *Medii de cultură.* Se folosesc medii lichide cu o valoare nutritivă ridicată, pentru a permite creșterea a cît mai multe specii de bacterii.

În țara noastră se recomandă folosirea *mediului 1*, care satisface acest deziderat prin conținutul său în hidrolizat pancreatic de cazeină, glucoză, extract de drojdie de bere, cistină, acid tioglicolic. La nevoie, putem folosi bulion glucozat 1%.

Pentru cultivarea germenilor anaerobi este preferabil ca recoltarea să se facă cu set de transfer, iar însămînțarea se va face în

mediul 1, regenerat în prealabil pentru eliminarea oxigenului și repartizat în tuburi mari, pentru a micșora suprafața de contact a mediului cu aerul atmosferic.

Hemocultura pentru ciuperci se face pe medii adecvate. În acest scop se recomandă *mediul 2* (mediul Sabouraud lichid).

În general, se folosesc 100—300 ml mediu de cultură, în funcție de volumul de sînge, pentru a se realiza o proporție de 10%.

Mediile de cultură astfel însămîntate sînt incubate în termostaț, preferabil într-un container cu atmosferă de CO₂, timp de 14 zile sau chiar mai mult, în cazul unor germeni mai greu cultivabili (ex. *Brucella*) sau cînd recoltarea sîngelui pentru hemocultură s-a făcut după începerea tratamentului cu antibiotice.

Mediile sînt examinate zilnic, iar în cazul în care se tulbură sau se produc hemoliză, gaz, sediment sau peliculă la suprafață se fac examene microscopice directe (preparate native între lamă și lamelă sau frotiuri colorate). În funcție de rezultatele acestor examene directe se fac însămîntări pe medii adecvate (geloză-sînge, geloză-lactoză cu albastru de bromtimol), cu incubare în aerobioză și, în paralel, în anaerobioză, pentru obținerea de subculturi și a unor informații preliminare privind identitatea germenilor.

De asemenea, se testează sensibilitatea germenilor respectivi la antibiotice și chimioterapice (antibiograma), iar cînd există suspiciunea unei salmoneloze se identifică rapid prin aglutinări pe lamă cu seruri specifice anti-O, anti-H și, eventual, anti-Vi.

Cînd, la 48 ore de la introducerea sîngelui în mediile de cultură, nu apar modificări macroscopice, se fac treceri „oarbe” pe geloză-sînge, repetate la 6 zile, și frotiuri de control colorate Gram.

Ținînd cont de severitatea oricărei septicemii și avînd în vedere ușurința cu care sîngele se poate contamina cu microbi, sîntem obligați să ne asigurăm că hemocultura pozitivă reflectă o bacteriemie reală. De aceea, se vor face culturi repetate și se va urmări dacă se dezvoltă un număr mare de colonii din același tip în culturile cantitative.

Cînd însă numărul de germeni este mic și aparțin mai multor specii bacteriene, este foarte probabil că sîngele a fost contaminat.

În cazul hemoculturilor pozitive, identificarea germenilor se face pe baza caracterelor morfologice, biochimice și serologice, acolo unde este cazul.

3. Inocularea sîngelui la animale de laborator este necesară în cazuri speciale. Sîngele trebuie inoculat la animale sau în oul embrionat imediat după recoltare sau, dacă acest lucru nu este posibil, trebuie făcut necoagulabil prin defibrinare cu perle de sticlă sau prin folosirea unor substanțe anticoagulante.

15.2. EXAMENUL PARAZITOLOGIC AL SÎNGELUI

În sînge pot fi puși în evidență următorii paraziți : *Plasmodium malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *Trypanosoma spiralis*, *Toxoplasma gondii* etc.

Recoltarea sîngelui se face cu puțin timp înainte sau în cursul accesului febril, din pulpa degetului inelar sau mijlociu. Se șterge bine cu alcool pulpa degetului. După ce se usucă se înțeapă cu acul, se îndepărtează prima picătură de sînge cu vată uscată și din picătura următoare fie se face un preparat proaspăt, fie se face un frotiu pe o lamă foarte curată și flambată în prealabil. Se notează direct pe lamă numele bolnavului sau numărul de identificare.

Frotiul este fixat cu alcool etilic 5—10 min, cu alcool metilic 3—5 min, sau cu soluție May-Grünwald 5 min.

Pentru colorare se recomandă fie metoda May-Grünwald-Giemsa, fie metoda rapidă Leishman.

Metoda May-Grünwald-Giemsa. Se acoperă frotiul de sînge cu soluție May-Grünwald 3—5 min pentru fixare. În continuare, se adaugă peste frotiu un număr egal de picături de apă distilată, care se amestecă printr-o înclinare ușoară a lamei. După 6 min se varsă lichidul și, fără a spăla lama, se introduc într-o baie de colorat Giemsa preparată extemporaneu cîte 3 picături soluție Giemsa la 2 ml apă distilată. După 20—40 min se scot lamele, se spală cu apă și, după uscare, frotiul este examinat la microscop cu obiectivul cu imersie.

Metoda Leishman. Peste frotiu se toarnă 10—15 picături de colorant. După 30 s se adaugă o cantitate egală de apă distilată și amestecul este menținut astfel 10 min. Se spală lama cu apă și după uscare se examinează la microscop.

Picătura groasă este o metodă frecvent utilizată, deoarece dă posibilitatea ca pe un frotiu să fie examinată o cantitate mai mare de sînge. Recoltarea se face din pulpa degetului, după tehnica amintită mai sus. Se iau 2—3 picături de sînge și, cu colțul unei lame, se amestecă pentru omogenizare și defibrinare. După recoltare, lamele sînt puse sub un capac de cutie Pétri pînă se usucă preparatul.

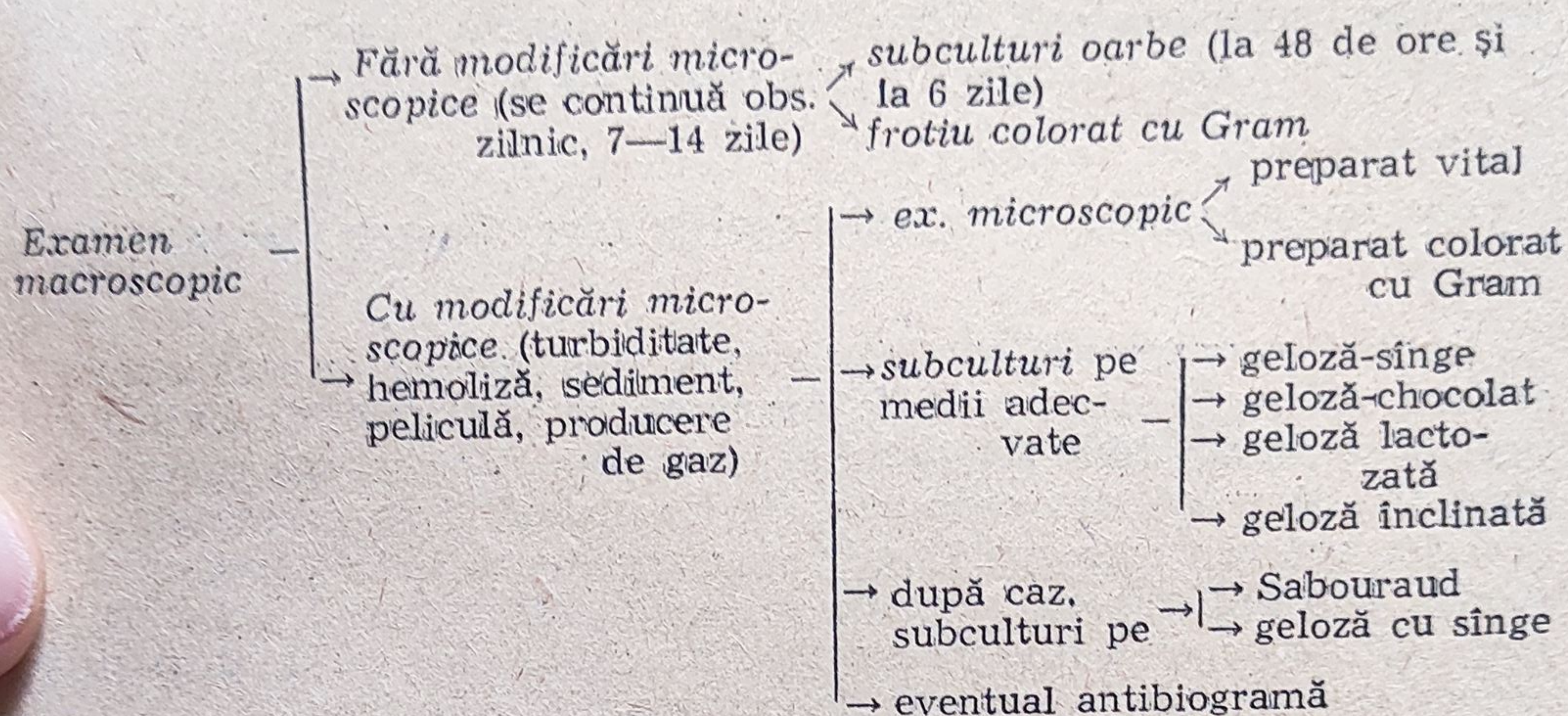
Înainte de colorare se face hemoliza prin introducerea lamelor în apă, pînă cînd picătura devine albă-cenușie. Cînd picăturile de sînge sînt mai vechi, este necesar ca apa de hemoliză să fie acidulată 5% cu acid acetic glacial ; ulterior, lamele sînt spălate în apă simplă.

Colorarea se face direct în baia cu soluție Giemsa. După colorare lamele sînt spălate cu apă și sînt examinate la microscop.

Tabel recapitulativ

I. Recoltarea — balon pentru b. aerobi — mediu nr. 1
hemocultură ↘ b. anaerobi

II. Examinarea hemoculturii



Următoarele 48 de ore

În cazul culturilor pozitive, obținute pe mediile însămînțate cu transplant:

- a) Identificarea de gen sau de specie — proprietăți —
- morfologice
 - culturale
 - biochimice
- pentru salmonele și meningococ — și identificare serologică
- pentru suspiciune de *Salmonella typhi* anunțarea ↗ laborator pentru
imediată a rezultatelor; trimiterea tulpinii la ↘ identificare
Inst. Cantacuzino
- b) Efectuarea antibiogramei (în caz urgent, și prin metoda rapidă)

Hemocultura (după dr. V. Rusu)

Metoda de concentrare este utilizată pentru punerea în evidență a unor larve de paraziți (de exemplu, trichinele). În acest scop, se folosesc tehnici speciale.

În general, examenele bacteriologice și parazitologice ale sîngelui trebuie completate cu examene serologice și examene hematologice. Prezența unor anticorpi specifici în ser sau depistarea unor modificări apărute în tabloul sanguin pot aduce informații prețioase pentru precizarea diagnosticului de laborator.

Tema 16

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL APEI

Analiza bacteriologică a apei este obligatorie, deoarece un număr mare de bacterioze ca : *febra tifoidă*, *dizenteria*, *holera*, *tularemia*, *leptospirozele* etc. se transmit prin intermediul ei.

16.1. RECOLTAREA ȘI TRANSPORTUL APEI PENTRU ANALIZĂ

Pentru ca examenul să aibă valoare, este necesar ca recoltarea să se facă corect. În cazul apei de conductă, ca și al celei de fântină cu pompa, se va deschide robinetul și se va lăsa să se scurgă câteva minute apa stagnată din conductă. Se flambează gura robinetului, se lasă din nou să curgă apa 10 min și se recoltează 150 ml într-o sticlă sterilă. Din fântinile cu cumpănă se recoltează cu vasul obișnuit la scos ; din izvor, cu o lingură sterilă ; din râu sau lac, cu un dispozitiv special care permite recoltarea de la o anumită adâncime.

Recomandabil, este ca însămînțarea să se facă chiar la locul recoltării ; cum aceasta nu este totdeauna posibil, transportul probelor se va face cât mai repede, în lăzi izoterme, pentru a se asigura o temperatură în jur de 6°C, fiecare probă fiind însoțită de o fișă explicativă.

După un *examen organoleptic* se va trece la cel *bacteriologic* propriu-zis, care va urmări să stabilească numărul total de germeni dintr-o anumită cantitate de apă (examenul cantitativ), să determine speciile microbiene care habitează în intestinul omului și animalelor (examenul calitativ) și să identifice germenii patogeni.

16.2. ANALIZA CANTITATIVĂ

Se fac însămînțări pe medii de cultură, știind că din fiecare germe însămînțat pe un mediu rezultă o colonie. Se agită bine fiecare eșantion și se pipetează câte 1 ml și, respectiv, 0,1 ml în câte două serii cu cutii Pétri. Atunci cînd este vorba de o apă foarte poluată, se vor face, în prealabil, diluții, mai mari în apă distilată.

În prima serie de cutii Pétri se toarnă câte 15 ml geloză topită și răcită la 45°C, iar în cea de a doua aceeași cantitate de gelatină. După omogenizare se termostatează 48 h : primele la 37°C, ultimele

la 20°C. Apoi se trece la numărarea coloniilor dezvoltate pe fiecare placă. Ținând cont de diluția realizată, rezultatul se va exprima separat pentru fiecare serie, raportat la 1 ml. Germenii dezvoltați pe gelatină sînt cei naturali ai apei și sînt nepatogeni pentru om.

Pentru exemplificarea calculului : dacă pe placa însămînțată cu 1 ml s-au dezvoltat 40 colonii, iar pe cea însămînțată cu 0,1 ml, 6 colonii (ceea ce înseamnă 60 pe ml), atunci $40 + 60 = 100$ germeni în cantitatea de 2 ml = 50 germeni/ml apă.

Apa este socotită pură cînd conține pînă la 1 000 germeni și foarte impură cînd conține peste 100 000 germeni/ml.

16.3. ANALIZA CALITATIVĂ

Această analiză urmărește evidențierea *B. coli*, a *bacteriofagului* specific și a *germenilor patogeni*.

Colimetria reprezintă analiza calitativă a apei, *b. coli* „satelit” al germenilor patogeni servind ca martor al poluării apei. Se însămînțează volume egale și cunoscute de apă în mai multe serii de eprubete mari, cu bulion lactozat cu albastru de bromtimol și tub de gaz. *B. coli*, fermentînd lactoza, acidifică mediul și produce gaz cel puțin 1/10 din volumul tubului. În tubul în care lactoza a fost fermentată și s-a produs gaz în cantitate suficientă, a fost însămînțat cel puțin un colibacil. Prin această metodă de lucru se stabilește care este numărul de *b. coli* la litrul de apă.

După acest **test de prezumție** se trece la **testul de confirmare**, însămînțînd din tuburile cu cea mai mică cantitate de apă, în care s-a dezvoltat gaz suficient, pe medii lichide și solide ce permit dezvoltarea caracteristică a colibacilului, urmînd ca apoi să se facă identificarea prin metode morfologice, biochimice și fermentative. Prezența *b. coli* indică poluarea excretală a apei.

Prin prisma rezultatelor celor două investigații, apa, pentru a fi socotită potabilă, nu trebuie să aibă nici un *b. coli* la litru, iar numărul total de alți germeni nu trebuie să depășească 100 pe ml.

16.4. IDENTIFICAREA GERMENILOR PATOGENI

Chiar în cazul unor epidemii hidrice evidente epidemiologic, operațiunea de identificare a germenilor patogeni este destul de dificilă fie datorită intervenției tardive, fie datorită diluției mari a acestor germeni în apa de cercetat. Totuși, ea se poate face : în cazul

b. tific, trecînd cantități mari de apă printr-un filtru Seitz și însămîntînd bucățile de filtru pe mediile cunoscute, iar în cazul b. dizenteric, însămîntînd sedimentul centrifugat (30 min la 3 000 ture) al apei precipitate cu sulfat de aluminiu; în cazul vibrionului holerici, examenul se începe însămîntînd 900 ml apă în 100 ml apă peptonată concentrată; pentru cercetarea leptospirelor, metoda cea mai recomandată este cea care folosește cobaiul (în greutate de 150 g), epilat și scarificat pe pielea abdomenului, introdus într-un cristalizor cu apa de cercetat, timp de 4 h.

Temă 17

EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL ALIMENTELOR

Analiza bacteriologică a alimentelor este frecvent solicitată, întrucît consumul de alimente contaminate cu germeni provoacă îmbolnăviri cunoscute sub numele de **toxiinfecții alimentare**.

Recoltarea probelor trebuie să se facă de asemenea manieră încît proba să reprezinte toate calitățile alimentului de analizat. În cazul alimentelor ușor alterabile, transportul lor se va face urgent și la temperatură scăzută.

Rolul laboratorului este deosebit, întrucît el este singurul în măsură să stabilească etiologia toxiinfecției, cu atît mai mult cu cît alimentul nu prezintă nici o modificare din punct de vedere organoleptic.

17.1. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL CĂRNII

Examenul este obligatoriu în cazul tăierilor de necesitate, cînd nu se știe precis boala de care a suferit animalul, acolo unde informațiile dau de bănuț sau cînd eviscerarea s-a făcut mai tîrziu de 2 ore de la tăiere. În toate situațiile sînt necesare organele interne, țesutul muscular și ganglionii, toate însoțite de o fișă explicativă.

Analiza urmărește să pună în evidență, în primul rând, germenii patogeni și, în al doilea rând, să stabilească numărul germenilor banali, care, deși saprofiți, pot degrada unele substanțe din aliment pînă la formarea de substanțe toxice.

În laborator se vor face următoarele examene :

Examenul microscopic direct. Frotiurile făcute de la suprafața și profunzimea probei, după uscare, se degresează cu toluen și se fixează cu alcool. Colorate Gram, vor arăta numărul, varietatea și afinitatea tinctorială a florei microbiene. Pe un preparat proaspăt se va cerceta mobilitatea acesteia.

Numărarea germenilor. Suprafața bucății de carne se sterilizează cu ajutorul unei spatule înroșite, se detașează un fragment care se cîntărește și apoi se triturează cu ser fiziologic steril. Se fac diluții seriate. Din fiecare diluție se trece cîte 1 ml în cîte două serii de cutii Pétri, peste care se toarnă geloză topită și răcită la 45°C. O serie se termostatează la 37°C, iar cealaltă se lasă la temperatura camerei. După 48 h numărul coloniilor dezvoltate, ținînd cont de diluție, se exprimă pe gram de produs.

Însămînțarea pe medii. Mediile folosite vor fi cît mai variate, pentru a da posibilitatea celor mai diverse specii microbiene, ce pot fi întîlnite în asemenea situații, să se dezvolte. În condiții sterile vor fi însămînțate fragmente mici de produs, triturate cu ser fiziologic steril.

Întrucît cercetările au arătat că și germenii așa-zisi banali, prin activitatea enzimatică pe care o exercită asupra proteinelor și prin decarboxilarea histidinei cu formare de histamină, pot provoca fenomene de intoxicație alimentară acută, atenția laboratorului va fi îndreptată și asupra acestora. De exemplu, din 34 de tulpini de *B. coli* izolate din alimente, 31 au fost producătoare de histamină. Acțiunea acestor germeni asupra proteinelor se pune în evidență prin trei teste : *producerea de H₂S*, *producerea de indol* și *lichefierea gelatinei*, cunoscută sub numele de testul H.I.L.

În funcție de rezultatele obținute la probele efectuate, interpretarea ar fi următoarea :

— prezența germenilor patogeni sau a toxinei botulinice interzice punerea în consum a cărnii ;

— rezultatul examenului microscopic direct, puțin favorabil, asociat cu prezența de H₂S, dar fără prezența indolului, permite consumul cărnii numai după o riguroasă prelucrare termică ;

— dacă rezultatul bacterioscopic este nefavorabil și se asociază cu prezența indolului și a hidrogenului sulfurat, se interzice punerea în consum a cărnii.

17.2. EXAMENUL DERIVATELOR DIN CARNE ȘI MEZELURILOR

Întrucît toate aceste preparate sînt nefierte, ele vor fi întotdeauna contaminate, fapt care face ca numai punerea în evidență a germinilor patogeni și rezultatele examenelor bacterioscopice să hotărască atitudinea, testul indolului, gelatinei și al H_2S fiind totdeauna pozitive.

Se consideră preparate cu prospețime dubioasă cele în care frotiul pune în evidență 10—30 germeni (coci și rari bacili) Grampozitivi. Un număr de peste 30 germeni pe cîmp, germeni Grampozitivi și negativi, interzice punerea în consum a acestor preparate.

În cazul în care în probe se pun în evidență stafilococi, chiar în număr foarte mare, ele nu vor fi eliminate dacă în determinările făcute nu se evidențiază anterotoxină.

Prezența în preparatele din carne cu caractere organoleptice normale a bacteriilor saprofite aerobe sau a bacteriilor anaerobe nepatogene nu constituie o contraindicație pentru consum.

17.3. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL CONSERVELOR

Cutiile de cercetat se termostatează timp de 7 zile, după care se scot și se examinează : cele care au capacul bombat sînt reținute și trecute în registru ; celelalte se șterg bine cu un tifon și apoi se flambează.

Cu ajutorul unui dispozitiv special, reprezentat de un cui metalic gros, prevăzut cu un scut de protecție la 6—8 cm de vîrf, flambat la un bec de gaz, se perforează cutia. La deschiderea cutiei se urmărește dacă se degajă sau nu gaz, dacă mirosul sau consistența sînt modificate. Cu o pipetă Pasteur cu bulă și deschidere largă se aspiră material din diferite puncte, din care se fac însămînțări pe diferite medii de cultură, aerobe și anaerobe, frotiuri și preparate proaspete.

Cînd se analizează conservele de legume, tehnica de lucru va fi aceeași, numai că însămînțările vor fi făcute și pe Sabouraud. Se atrage atenția că în conservele de legume și, în special, a celor de casă, se poate decela bacilul botulinic.

17.4. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL OUĂLOR

Ouăle de analizat se spală bine cu apă și săpun cu ajutorul unei perii de unghii, după care se țin cîtva timp în alcool de 70°. Se scot și se usucă. Se flambează extremitatea în dreptul camerei de aer și, cu ajutorul unei pile de tăiat fiole sau a unei freze dentare ste-

rile, se taie un căpăcel din coajă. Cu ajutorul unor pipete Pasteur cu bulă se extrag separat albușul și gălbenușul, care apoi se însămânțează pe medii de cultură cât mai variate.

17.5. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL LAPTELUI

Această analiză se face laptelui crud (cînd se bănuiește contaminarea lui de la un animal bolnav sau cînd se urmăresc purtătorii de germeni), laptelui pasteurizat, înghețatei de lapte și derivatelor de lapte care se consumă ca atare : frișcă, smîntînă, lapte bătut.

Recoltarea probelor se va face în sticle sau borcane sterile, cu pipete sau polonice sterile, după o perfectă agitare a probei. Transportul se va face la rece, în timpul cel mai scurt.

În laborator se vor urmări : numărul total de germeni, numărul probabil de coliformi, prezența germenilor patogeni, proba reductazei.

Pentru **determinarea germenilor din grupul coli** examenul se efectuează după tehnica cunoscută de la analiza apei.

Cercetarea germenilor patogeni se face prin însămînțarea sedimentului obținut după centrifugarea a 30—40 ml lapte în selenit acid de sodiu și pe Leifson, pentru *salmonelle* și *shigelle* ; pe plăci cu geloză-sînge pentru *streptococul hemolitic*, *enterococ*, *Streptococcus galactiae* și pe Löwenstein pentru cercetarea *B. Koch* ; pentru cercetarea germenilor din genul *Brucella* se practică reacția de aglutinare a laptelui ecremat sau a lactoserului cu ajutorul antigenului colorat brucelos.

Pentru **determinarea numărului total de germeni**, laptele este diluat cu apă de robinet sterilă. Din diluțiile făcute se fac însămînțări pe plăci cu geloză topită și răcită la 50°C, prin încorporare. După 48 h de termostatare, la 37°C, se numără coloniile dezvoltate și se calculează numărul de germeni, ținînd cont de diluție.

Proba reductazei determină indirect numărul de germeni aflați în lapte, măsurînd timpul necesar decolorării albastrului de metilen prin acțiunea oxido-reducătoare a acestora. Ea se practică astfel : într-o eprubetă spălată cu apă fierbinte se pun 5 ml soluție albastru de metilen, proaspăt preparată (5 ml sol. alcoolică saturată de albastru + 195 ml apă distilată) și 20 ml de lapte de cercetat, încălzit în prealabil la 37°C. Eprubeta se agită bine și se introduce la termostat. Decolorarea se urmărește la trei intervale : după 20 min, după 2 h și după 5 1/2 h. Proba poate fi considerată terminată cînd întreg conținutul eprubetei s-a decolorat.

În raport cu timpul necesar decolorării, laptele se împarte în 4 clase. Dacă timpul de decolorare este peste 5 1/2 h, calitatea lap-

telui este bună, întrucît numărul de germeni este sub 500 000 germeni pe 1 ml lapte ; dacă decolorarea s-a făcut între 2 h și 5 1/2 h, laptele este considerat satisfăcător, numărul de germeni fiind între 500 000 și 4 milioane ; dacă decolorarea s-a făcut între 20 min și 2 h, calitatea laptelui este proastă, numărul de germeni fiind între 4 și 20 milioane ; dacă decolorarea s-a făcut sub 20 min, calitatea este foarte proastă, conținînd peste 20 milioane germeni.

În cazul derivatelor din lapte, acestea se vor dilua 1/10 cu apă sterilă, fiind apoi analizate, ca și laptele.

Pentru examenul untului se va cîntări un fragment de 5 g din centrul bucății și se va introduce în 15 ml bilă de bou sterilă, se încălzește la 37°C, se agită și 5 ml emulsie se însămîntează în 100 ml apă peptonată 3‰, la care se adaugă 2,5 ml verde malahit 1/200. Incubarea se face la 37°C. Cînd colorantul se decolorează, se fac treceri pe medii.

Tema 18

ANALIZA BACTERIOLOGICĂ A SOLULUI ȘI AERULUI

18.1. ANALIZA BACTERIOLOGICĂ A SOLULUI

Prezența substanțelor organice este factorul care condiționează bacteriologia solului.

La germenii proprii solului se adaugă germenii diseminați de dejectele omului și animalelor.

Analiza bacteriologică urmărește să pună în evidență germenii socotiți a fi indicatori generali sau specifici ai impurificării solului, în special în zonele locuite, a celor tributare surselor de apă sau a celor irigate, folosite pentru cultivarea legumelor și zarzavaturilor.

Pentru ca rezultatele analizelor să fie cît mai concludente, se vor alege pentru **recoltare** locurile cele mai reprezentative. Se vor recolta cîte 100 g sol, cu ajutorul unei lopeți, de la adîncimea de 10—20 cm, fiecare probă fiind introdusă într-un vas steril, care va fi expediat cît mai repede, la temperatură scăzută. Proba va fi însoțită de o fișă în care se vor specifica motivele cercetării, ca și datele topografice necesare.

În laborator, fiecare eșantion va fi cernut printr-o sită de sîrmă cu ochiurile de 3 mm. Din fiecare probă se vor lua 10 g sol cernut,

pentru a fi mojarat în 100 ml apă distilată sterilă. Se transvazează într-un flacon de sticlă, se agită bine 10 min, după care se lasă în repaus 2 minute.

Pentru a se determina numărul total de germeni, se vor face diluții, uneori chiar peste 1/1 000 000. Din ultimele diluții se trece câte 1 ml în cutii Pétri, peste care se toarnă câte 10 ml geloză topită și răcită la 45°C. După omogenizare, termostatarea se va face 48 h la 25—30°C.

Calculul se face numărînd coloniile dezvoltate, ținînd cont de diluție și raportînd la 1 g sol.

Pentru cercetarea germenilor din grupul *B coli*, însămînțările se vor face pe bulion lactozat cu albastru de bromtimol și tub de gaz, cu treceri ulterioare pe medii solide diferențiate. Prezența *B. coli* fecaloid indică o impurificare excretală a solului.

Pentru determinarea germenilor patogeni: *tific, dizenteric, carbunos, tetanic, pestos* etc. însămînțările vor fi făcute urmînd linia cunoscută pentru fiecare germene în parte.

Cînd examenul vizează germenii anaerobi din sol, în special *B. perfringens*, care indică impurificarea fecaloidă a solului, diluțiile vor fi încălzite în prealabil 15 min la 80°C și apoi însămînțate pe medii anaerobe ce vor fi incubate 24 h la 37°C.

Prin prisma rezultatelor obținute la aceste determinări, se pot trage concluzii în legătură cu starea sanitară a terenului de cercetat și, în cazul impurificării, a măsurilor ce trebuie luate.

18.2. ANALIZA BACTERIOLOGICĂ A AERULUI

Majoritatea germenilor aflați în aerul încăperilor sînt germeni nepatogeni. Totuși, se consideră că numărul mare al acestora poate duce la poluarea aerului.

Privind această microaerofloră numai cantitativ, lucrurile sînt incomplet elucidate și, deci, este absolut necesară cercetarea calitativă a aerului, întrucît unele specii pot orienta asupra sursei lor. Astfel, evidențierea unui streptococ hemolitic va duce la concluzia unei impurificări cu floră aparținînd căilor aeriene superioare, în timp ce prezența *b. coli*, la impurificarea cu praf ce conține materii fecale.

Metodele de analiza aerului sînt multiple, însă sistematizate pot fi împărțite în: *metode de sedimentare* și *metode aspirative*.

Metoda Koch, din prima categorie, este cea mai simplă și, deci, cea mai utilizată, rezultatele ei fiind suficient de concludente.

Se folosesc cutii Pétri cu geloză și geloză-sînge ce se lasă deschise pe diferite suporturi 10 min, timp în care în încăperea nu sînt permise mișcări de aer. După epuizarea timpului cutiile se închid. Se incubează la 37°C.

Se determină numărul total de germeni și numărul de germeni hemolitici pe 1 m³ aer după formula :
$$\frac{N \times 10\,000}{S \times K},$$

în care : *N* este numărul germenilor dezvoltăți pe placă ; *S* — suprafața în cm² a cutiei Pétri ; *K* — constanta de expunere (2 pentru 10 min).

Limitele admise sînt următoarele : în sălile de operații, pînă la 300 germeni pe m³ ; în saloanele de copii între 0—1 an, sălile de alăptare, de naștere, precum și în saloanele de terapie intensivă și reanimare, pînă la 500 germeni pe m³, cu condiția ca germenii hemolitici să fie absenți.

Tema 19

TOXIINFECȚIILE ALIMENTARE

Toxiinfecțiile alimentare sînt afecțiuni digestive de tip acut sau subacut, care apar fie sub formă de cazuri izolate, fie sub forma unor îmbolnăviri. Ele pot cuprinde un număr mai mare sau mai mic de persoane care au consumat același aliment contaminat, cu același germene sau cu toxinele sale.

Sursa de infecție este constituită de om și animale bolnave sau purtătoare de germeni, iar transmiterea agentului infecțios se face prin alimente.

Debutul bolii este brusc și se caracterizează prin tulburări gastro-intestinale și fenomene de intoxicație generală.

Epidemiile izbucnesc, de obicei, în sezonul cald, apariția lor fiind favorizată de nerespectarea regulilor de igienă alimentară.

Din punct de vedere clinic, toxiinfecțiile alimentare pot îmbrăca două forme : după predominanța caracterului infecțios sau al celui toxic.

Forma infecțioasă se datorează multiplicării germenilor din alimentele consumate. Se caracterizează printr-o perioadă de incubatie mai lungă, cu evoluție febrilă, dureri de cap, greață, vărsături, diaree, dureri abdominale și care poate duce la moarte. Durata bolii este de 3—5 zile, după care urmează dispariția simptomelor.

Forma toxică este cauzată de toxinele elaborate de unii germeni în alimentele contaminate. Se caracterizează printr-o perioadă de

incubație foarte scurtă, cu vărsături, diaree, stare de intoxicație și febră moderată sau chiar absentă. Durata bolii este scurtă, de 24 ore sau mai puțin, cu excepția botulismului, în care boala se prelungește foarte mult.

Datorită evoluției scurte a bolii, în toxiinfecțiile alimentare nu are timp să se instaleze o imunitate împotriva agenților patogeni.

Germenii care pot provoca toxiinfecțiile alimentare sînt :

a. *Enterobacteriacee* : *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* și *Proteus* ;

b. *cocii patogeni enterotoxici* : stafilococi și streptococi enterotoxici ;

c. *bacilii aerobi formatori de spori* : *B. subtilis*, *B. cereus* și *B. anthracis* ;

d. *bacilii anaerobi formatori de spori* : *Clostridium perfringens* și *Cl. botulinum* ;

e. *bacteriile care degradează alimentele pînă la formarea unor substanțe toxice*.

19.1. TOXIINFECȚIILE ALIMENTARE DE TIP INFECȚIOS

Bolile de acest tip sînt provocate în special de *salmonelle*. Debutul bolii este brusc (după 8—24 ore), cu stare generală alterată, ridicarea temperaturii la 38—40°C, dureri de cap, greață, vărsături și scaune diareice frecvente, apoase sau mucoase, uneori un aspect dizenteriform. După 2—4 zile, în mod obișnuit, aceste simptome dispar, iar scaunele se normalizează. Au fost semnalate și cazuri în care boala se poate agrava, căpătînd un aspect septicemic cu evoluție gravă, care poate merge pînă la moartea bolnavului. Ca tratament, la regimul dietetic se pot asocia unele antibiotice, cum sînt cloramfenicolul, streptomycină etc., care pot scurta evoluția bolii.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea și identificarea *salmonellei*. Cercetarea se face pe următoarele produse :

— produse patologice recoltate de la bolnavi : materii fecale, vărsături, urină și, eventual, sînge ;

— alimente sau apă suspecte de a fi contaminate ;

— produse (materii fecale și urină) recoltate de la suspecti, contacți, foști bolnavi, personalul care a mînuit sau a prelucrat alimentele ;

— fragmente de organe recoltate : splină, ganglioni mezenterici, intestin etc., precum și sînge prelevat direct din inimă.

Recoltarea produselor va fi făcută în condiții aseptice, în vase sterilizate prin căldură și bine închise. Toate probele vor fi însoțite

de o fișă care va cuprinde numele persoanei de la care s-a făcut recoltarea, data (ziua și ora) recoltării, istoricul bolii pe scurt, diagnosticul clinic, tratamentul aplicat etc.

Coprocultura. Materiile fecale (cu vărsăturile se procedează la fel) vor fi însămânțate pe *medii de îmbogățire* (mediul Müller-Kauffman sau mediul cu selenit acid de sodiu) și, concomitent, pe *medii selective* (Wilson-Blair sau Istrati-Meitert). După o incubare la 37°C, timp de 12—24 ore, se fac treceri pe medii selective (Wilson-Blair sau pe Istrati-Meitert). După 48 de ore (pentru Wilson-Blair) de incubare, la 37°C, coloniile suspecte de *Salmonella* (colonii negre, cu diametrul de 1—2 mm, turtite, aderente la mediu, cu luciu metalic sau colonii mari verzi-albăstrui) trebuie trecute cu ansa pe un mediu diferențial (Drigalski sau geloză lactozată cu albastru de bromtimol), pentru a putea fi studiate în continuare.

Pe mediul Istrati-Meitert, coloniile de *Salmonella* apar după 24 de ore și sînt verzi-albăstrui.

Culturile pure obținute pe geloză nutritivă vor fi supuse identificării, prin cercetarea caracterelor morfologice, biochimice și pentru identificare serologică.

Urocultura. Urina (sau sedimentul obținut prin centrifugare) este însămânțată pe un mediu de îmbogățire și direct pe medii diferențiale și selective. După izolare culturile sînt identificate morfologic, biochimic și serologic.

Hemocultura. Sîngele recoltat (10 ml) în mod steril va fi însămânțat pe 100—150 ml mediu, care conține în părți egale bulion simplu și bilă sterilă de bou. După incubare la 37°C se vor efectua treceri pe tuburi de geloză nutritivă 2%, înclinată. În cazul unor rezultate negative, mediul cu bulion va fi urmărit 7 zile. Culturile pure obținute sînt cercetate în continuare pentru identificare prin metode morfologice, biochimice și serologice.

Fragmente de organe recoltate sînt triturate în mojar cu ser fiziologic steril. Însămînțarea se face pe medii de îmbogățire cu treceri pe medii solide, urmînd izolarea și identificarea germenilor.

Alimentele vor fi fragmentate, triturate și suspensionate în ser fiziologic înainte de a fi însămînțate pe medii de îmbogățire și, concomitent, pe medii selective.

Înainte de însămînțare, probele de alimente vor fi cercetate mai întîi macroscopic (aspect, culoare, consistență, miros) și prin examen microscopic direct (frotiuri colorate). De asemenea, din probele recoltate se fac numărători de germeni pe diluții în ser fiziologic, pentru a se putea face o apreciere asupra gradului de contaminare a alimentului respectiv.

Apa va fi supusă unor metode de concentrare a germenilor (centrifugare, filtrare, precipitare), după care depozitul obținut va fi introdus în medii de îmbogățire și selective.

19.2. TOXIINFECȚIILE ALIMENTARE DE TIP TOXIC

Sînt cauzate, în principal, de *stafilococii enterotoxici* și *b. botulinic*.

1. **Stafilococii enterotoxici** produc toxiinfecții alimentare cu o perioadă de incubație scurtă (1—6 ore) și debutează cu salivă, greață, vărsături, crampe abdominale și scaune diareice. Temperatura este, de obicei, normală. După 12—48 ore fenomenele de boală dispar și survine vindecarea. Boala se datorește enterotoxinei stafilococice. Sursa de infecție este constituită de animalele bolnave (carnea și laptele lor), de omul bolnav care prezintă infecții stafilococice ale pielii, furuncule etc. și de purtătorii de germeni (nazali, nazo-faringieni, fecali etc.), care mînuiesc alimentele. Alimentele bogate în proteine și glucide, contaminate cu stafilococi enterotoxici, oferă, la temperaturi convenabile (optimum 37°C), condiții bune de cultivare și de elaborare a enterotoxinei.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea stafilococilor în alimentele incriminate și în produsele patologice recoltate de la bolnav.

Recoltarea probelor din alimentele incriminate și a produselor patologice (vărsături, materii fecale, fragmente de organe etc.) se face în recipiente sterilizate prin căldură. Exsudatele rino-faringiene și secrețiile purulente sînt recoltate cu ajutorul tampoanelor cu vată sterile. Probele vor fi însoțite de o fișă care trebuie să cuprindă numele și prenumele pacientului, data recoltării, adresa etc.

Alimentele sînt examinate astfel : se cercetează aspectul macroscopic al acestora, se fac numărători de germeni (probele sînt triturate și suspensionate în ser fiziologic) prin însămînțarea lor pe geloză nutritivă 2% în plăci Pétri (în suprafață sau prin încorporare) și se fac frotiuri care se colorează după metoda Gram. Stafilococii sînt Gram-pozitivi, dispuși în grămezi.

Pentru cultivarea și izolarea stafilococilor din alimente, ca și din produsele patologice se folosesc în special mediile hiperclorurate.

Alimentele lichide sînt însămînțate ca atare într-un volum egal de mediu de îmbogățire hiperclorurat. Cele solide sînt în prealabil triturate și suspensionate în apă distilată. După incubare la 37°C se fac treceri pe *mediul solid hiperclorurat* (Chapman) sau pe *mediul hiperclorurat geloză-sînge* (Gamova-Kaiukova). Pe mediul Chapman,

după 24—48 ore, stafilococii fermentează manita și dau naștere la colonii galbene. Pe mediul Gamova-Kaiukova, stafilococii hemolitici formează colonii cu zonă de hemoliză în jur.

Culturile de stafilococ sînt apoi cercetate pentru patogenitate. Stafilococii formează colonii pigmentate, fermentează manita, coagulează plasma de om sau de iepure, produc fibrinolizină și sînt hemolitici.

Pentru depistarea stafilococilor enterotoxici, germenii sînt însămînțați pe un mediu special.

Vărsăturile și materiile fecale sînt cercetate după aceleași metode folosite la studiul alimentelor.

Exsudatele nazo-faringiene recoltate pe tampoane sînt suspensionate în apă distilată și pot fi dispersate direct pe medii hiperclorurate solide, ca și puroiul obținut în leziunile deschise. Puroiul scos din colecțiile închise va fi însămînțat direct pe bulion simplu și geloză nutritivă 2%.

2. Clostridium botulinum. Botulismul este o toxiinfecție alimentară care apare în urma consumului unor alimente (conserve de legume, cîrnați, șuncă, pește) contaminate cu *b. botulinic*. Boala se datorează toxinei care este cea mai puternică otravă cunoscută pînă astăzi.

Semnele bolii sînt caracteristice: tulburări ale stării generale (oboseală accentuată, amețeli, dureri de cap), tulburări de vedere (căderea pleoapelor, limitarea mișcărilor globilor oculari, vedere dublă), greutate la înghițit și la vorbire și, în cazuri grave, o paralizie musculară generală, urmată de moarte prin asfixie.

Diagnosticul de laborator se face, în primul rînd, prin identificarea toxinei butulinice în alimentele contaminate sau alte produse patologice și, mult mai rar, prin izolarea microbului cauzal din aceste produse.

Produsele patologice sînt: alimentul suspect (conservat), lichid de vărsătură, fecale, urină, sînge inactivat 30 min la 56°C, prelevate de la bolnav și fragmente de organe prelevate de la cadavru. Toate produsele patologice sînt centrifugate 15—20 min la 3 000 t/min și prelucrate cît mai rapid, pentru a evita contactul cu oxigenul atmosferic. Supernatantul servește la inocularea la cobai și șoarece. Sedimentul este suspendat în ser fiziologic steril și inactivat 30 min la 80°C pentru distrugerea formelor vegetative ale florei asociate nesporulate. După răcire se însămînțează într-un mediu de îmbogățire anaerob (bulion VF glucozat), iar cultura obținută după o incubare de 24—48 ore este dispersată pe plăci cu geloză preparată tot cu bulion VF agar 1,5%, glucoză 0,5% pH 7—7,2, cu adaos de

sînge 7—10%. După incubarea plăcilor în anaerobioză strictă (metoda pirogalolului alcalin), coloniile tipice de *Cl. botulinum* apărute sînt cercetate pentru caracterele morfologice, repicate în bulion VF și cultivate 3—4 zile la 37°C pentru obținerea de toxină.

Testul biologic de punere în evidență și identificare a toxinei botulinice se face prin inocularea la șoarece a suspensiei de supernatant obținut prin centrifugarea produsului patologic. Testul biologic poate fi efectuat și pe cobai.

19.3. PROFILAXIA TOXIINFECȚIILOR ALIMENTARE

Pe lângă măsurile de igienă generală, este necesar să se aplice și unele măsuri speciale referitoare la alimente și la personalul din sectorul alimentar.

Se va avea în vedere ca alimentele să nu provină de la animale bolnave. De asemenea, manipularea, modul de preparare, de conservare, de transport și de desfacere a alimentelor trebuie să fie astfel făcute încît să excludă posibilitatea de a se contamina cu germeni ce pot provoca toxiinfecții alimentare.

Măsurile sanitare de protecție a alimentelor privesc :

- salubritatea localului destinat blocului alimentar ;
- asigurarea apei potabile necesară preparării alimentelor și pentru întreținerea curățeniei ;
- îndepărtarea corectă a reziduurilor ;
- aplicarea măsurilor de prevenire și combatere a muștelor și rozătoarelor ;
- asigurarea unui circuit tehnologic corect care să evite alterarea și contaminarea alimentelor supuse prelucrării ;
- respectarea unui regim permanent de curățenie perfectă a localului, a utilajelor și vaselor ;
- păstrarea alimentelor la frigider pînă la folosire ;
- prelucrarea termică a alimentelor, care să asigure distrugerea agenților patogeni.

În ceea ce privește personalul care manipulează alimentele, acesta trebuie să respecte cîteva **reguli de igienă obligatorie** :

- spălarea mîinilor cu apă și săpun și uscarea lor, preferabil cu aer cald, înainte de a manipula un aliment ;
- alimentele să nu fie atinse direct cu mîna decît în cazurile în care acest lucru este strict necesar ;
- să folosească în mod corect materialul de protecție.

Controlul medical periodic al personalului din sectorul alimentar este obligatoriu.

Tema 20

INFECȚIILE INTRASPITALICEȘTI

Acest tip de infecții sînt contractate de bolnavi în cursul internării lor în spital. Ele sînt mai frecvente în serviciile de nou-născuți și în cele în care sînt spitalizați bolnavi cu rezistență scăzută la boală.

Agenții cauzali ai infecțiilor intraspitalicești pot fi *virusuri*, *bacterii*, *fungi* sau chiar *protozoare*.

Pentru aplicarea unor măsuri eficiente de prevenire și de tratament a infecțiilor intraspitalicești este necesar să se cunoască condițiile igienico-sanitare, existența și căile de circulație a germenilor în unitățile sanitare. Acest lucru este posibil dacă se efectuează controale bacteriologice sistematice.

20.1. CONTROLUL BACTERIOLOGIC AL PERSONALULUI MEDICO-SANITAR ȘI AL BOLNAVILOR

În cazul unui control preventiv se efectuează *controlul bacteriologic al tegumentelor*, *examenul exsudatului rinofaringian* și *coprocultura*.

1. Controlul tegumentelor. Controlul bacteriologic al tegumentelor se face întregului personal medico-sanitar și auxiliar de la saloane, blocuri operatorii, săli de naștere, săli de pansament, tratamente și terapie intensivă, puncte de transfuzie, precum și mamelor cu copii sugari internați în maternități și în spitale de pediatrie.

Ca *material de recoltare* se întrebuițează tampoane de vată hidrofilă cu tijă de lemn, introduse în eprubete. Tamponul se sterilizează prin căldură uscată. Înainte de folosire este umezit cu 1 ml apă peptonată 1‰ sau ser fiziologic peptonat 1‰ adăugat în eprubetă. Cu acest tampon se șterge întreaga suprafață palmară a mîinii drepte și a degetelor, insistîndu-se pe zonele periunghiulare și interdigitale și trecîndu-se tamponul de 2—3 ori peste fiecare zonă, rotindu-l neîncetat.

În mod identic se face ștergerea cu un tampon umezit a întregii suprafețe areolare mamare a mamelor, înainte de alăptarea copilului.

Însămînțarea probelor se face în minimum de timp de la recoltare, pentru a se preveni uscarea tampoanelor. Examenele de laborator urmăresc prezența : *B. coli*, *B. proteus*, *stafilococului hemolitic*.

În eprubeta fiecărui tampon se repartizează câte 9 ml ser fiziologic (peptonat 1‰). Tamponul se lasă 10—15 min în repaus, după care se face o agitare puternică, pentru eliberarea germenilor de pe vată și omogenizarea lor în lichidul de suspensie.

În toate cazurile pozitive se efectuează și antibiograma pentru tratament corespunzător.

În cazuri speciale, la controlul bacteriologic al tegumentelor se efectuează examene și pentru alți germeni, ca *B. pyocyaneus*, *Salmonella* etc.

2. Controlul rinofaringian. Prin controlul microbiologic al faringelui și al foselor nazale se urmărește depistarea surselor unor infecții aerogene.

Personalul asupra căruia se efectuează controlul este același ca la controlul tegumentelor, la care se adaugă copiii imaturi, gravidele și alte persoane spitalizate.

Recoltarea probelor se face cu tampoane de vată sterilă hidrofilă, fără a fi însă umezite înainte de folosire. Pentru fiecare persoană se folosesc câte două tampoane sterile : unul faringian și unul nazal.

Recoltarea se face prin ștergerea amigdalelor și a peretelui posterior al faringelui, și anume, prin rotirea tamponului. Cu cel de-al doilea tampon se face, de asemenea, prin rotire, ștergerea cornetului inferior și al secrețiilor nazale.

Recoltarea se face înainte de orice dezinfecție sau tratament local și la cel puțin 3—4 h după ingestia de alimente, de preferat dimineața înainte de masă.

Însămînțările probelor se fac în cel mult 2 h de la recoltare, pentru evitarea uscării produsului. Prin examenele de laborator se caută prezența *streptococului hemolitic din grupa A* și a *stafilococului hemolitic*.

Fiecare tampon se descarcă pe suprafața unui mediu cu geloză-sînge 5—10‰. Pentru obținerea de colonii izolate tamponul se șterge prin rotire, pe un sfert din suprafața mediului, după care, cu o baghetă de sticlă în formă de L, sterilă, se face întinderea exsudatului, printr-o mișcare de rotație pe restul suprafeței mediului.

Plăcile însămînțate sînt incubate timp de 24 h la 37°C. Coloniile de streptococ hemolitic se testează la bacitracină. Pentru depistarea stafilococului, tamponul este introdus în 4—5 ml de mediu hiperclorurat diluat 1/2 cu apă distilată sterilă. După 24 h de termostatare se face trecerea pe mediile Chapman solid și geloză-sînge. Coloniile de stafilococ hemolitic manitopozitive se cercetează și pentru celelalte caractere de patogenitate, cu efectuarea antibiogramei.

Coproculturile. La controlul coprologic vor fi supuse aceleași persoane ca și la examenul cutanat și nazofaringian.

Pentru recoltarea materiilor fecale se întrebuintează sonde Nelaton sterilizate prin autoclavare. După sondajul rectal, sonda se descarcă prin agitare în 4—5 ml ser fiziologic. Când lichidul de suspensie rămîne limpede sau foarte slab opalescent, recoltarea a fost defectuoasă și insuficientă, iar sondajul rectal va fi repetat.

Probele se însămîntează în cel mult 6 h de la recoltare, căutîndu-se prezența următorilor germeni : *Shigella*, *Salmonella*, *B. coli* patogen, *stafilococul enterotoxic*.

Emulsia de materii fecale în ser fiziologic se însămîntează cu o ansă direct pe mediile cu dezoxicolat de sodiu, cu bilă uscată (Istrati-Meiert) și cu geloză-sînge 5—10%, urmărindu-se obținerea unor culturi cît mai bogate de colonii izolate. Restul emulsiei se repartizează în mediu cu selenit de sodiu și mediu hiperclorurat. După 24 h la 37°C se face trecerea pe mediul cu bilă uscată sau pe geloză lactozată cu albastru de bromtimol și pe mediul Levin (agar-lactoză-albastru de metilen-eozină), iar din mediul hiperclorurat lichid, pe geloză-sînge și mediul Chapman.

Identificarea și confirmarea tulpinilor se fac serologic și biochimic.

Nu se admite prezența acestor germeni în coproculturi, deoarece ei reprezintă o sursă potențială de infecție intraspitalicească.

În cazuri speciale se urmărește și prezența altor germeni ca : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* etc.

20.2. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL STERILIZĂRII ȘI AL STERILITĂȚII

Controlul sterilizării. Pe lîngă metodele chimice și fizice ale controlului sterilizării, **metoda testelor microbiene** este tehnica cea mai utilizată pentru verificarea funcționării și a eficienței aparatelor de sterilizat, în special a autoclavelor.

În vederea controlului sterilizării se folosește o tulpină de *B. subtilis*, din care se prepară o suspensie microbiană în ser fiziologic în concentrație de 10^6 germeni/ml. Cu această suspensie se impregnează un număr de bucățele de pînză albă de 0,1—1 cm², sterilizate în prealabil, și care se lasă apoi la termostat să se usuce. 2—3 petice-test astfel preparate se introduc în plicuri de pînză albă sterile, cu dimensiunea aproximativă de 3—5 cm ; plicurile, la rîndul lor, se introduc fiecare în cîte un săculeț de pînză albă, iar săculețul într-o cutie Pétri sterilă.

Materialul astfel pregătît se lasă 5—6 zile la temperatura camerei, înainte de a fi folosit.

Cutiile Pétri cu teste microbiene se introduc în mijlocul casoletelor cu cîmpuri operatorii, meșe, tifoane etc., sau în cutii-instrumentar și se supun, împreună cu acestea, procesului de sterilizare (autoclavare). Totodată, se supun sterilizării și alte cutii cu teste care sînt plasate în afara casoletelor.

Se va avea grijă ca din seria de teste pregătite pentru acest control să rămînă și 1—2 cutii-martor care să nu fie supuse sterilizării.

După terminarea sterilizării, atît probele din casolete și cutii-instrumentar, cît și cele din afara acestora se vor aduce în laborator, unde peticele din pînză infectate vor fi scoase în mod steril din plicuri și însămîntate, fiecare separat, în cîte o eprubetă cu 10 ml bulion simplu. Concomitent, vor fi însămîntate și probele-martor, care nu au fost supuse procesului de sterilizare.

Probele vor fi ținute la termostat la 37°C și controlate timp de 3 zile.

Sterilizarea este eficientă dacă toate testele însămîntate, cu excepția probei-martor, rămîn sterile. Pentru a se evita o interpretare greșită, se vor verifica probele rămase nesterile dacă conțin, ca și proba martor, numai cultură de *B. subtilis*.

Controlul sterilității. Pentru efectuarea controlului sterilității sînt necesare eprubete conținînd 10—15 ml bulion simplu, precum și baloane de 100 și 250 ml cu gît larg, conținînd 50—150 ml bulion. Se mai folosesc, de asemenea, tampoane sterile, pregătite ca la controlul rinofaringian.

Controlul sterilității constă fie în introducerea obiectului de controlat în mediul de cultură, fie în ștergerea acestuia cu un tampon, care este, ulterior, însămîntat, sau spălarea obiectului cu mediu sau cu alt lichid care este, apoi, trecut în mediul de cultură.

Acele de seringă, de puncție, de sutură, de stomatologie, agrafele, ața chirurgicală, compresele mici, tetinele și orice alt instrumentar și material de dimensiuni mici vor fi introduse în mediile de cultură din eprubete sau baloane. Pentru ața chirurgicală, catgut și fire de setolină se face însămîntarea paralelă și pe un mediu lichid reductor (bulion-ficat-glucozat) pentru germeenii anaerobi.

Instrumentarul chirurgical care depășește înălțimea recipientului cu mediul de cultură se introduce cu un capăt în recipientul cu mediu, se spală printr-o agitare nu prea puternică, după care instrumentarul este îndepărtat și se aplică flaconului dopul de vată.

Obiectele mari ca inventarul moale sau piesele de instrumentar se șterg repede cu un tampon steril umezit în apă peptonată 1%. Tamponul se descarcă după cel mult 2 h de la recoltare în bulion simplu. Recipientele sterile de sticlă (biberoane, baloane etc.) se

controlează prin introducerea unei cantități de bulion simplu, egală cu 1/10 din volumul recipientului. După aceea, se pune dopul și se agită pe toată suprafața interioară. Recipientul cu bulion este pus apoi în termostaț.

Apa sterilă de la spălătorul blocului operator se însămânțează direct, 5—10 ml într-un balon sau eprubetă mai largă cu 20—50 ml bulion, flambându-se, în prealabil, gura robinetului și lăsându-se apa să curgă timp de 3—5 min înainte de recoltare.

Toate probele însămânțate pe medii pentru germeni aerobi și anaerobi se țin la 37°C și se urmăresc timp de 7 zile. La probele nesterile se determină specia microbiană care s-a dezvoltat.

20.3. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL CONDIȚIILOR IGIENICO-SANITARE

Aeromicroflora. Cunoașterea concentrației bacteriene din aer în sălile spitalului reprezintă un indicator prețios al potențialului infecțiilor aerogene posibile.

Metoda de recoltare volumetrică stabilește cu precizie relativ mare numărul de germeni pe volumul de aer, dar în practica curentă se folosește *metoda sedimentării Koch*, care este mai simplă și nu necesită aparatură pentru recoltare. În acest din urmă caz, pentru fiecare încăpere se folosesc două grupe de cutii Pétri cu diametrul de 10 cm, fiecare grupă cuprinzând câte o placă cu geloză simplă 2%, cu pH 7,4—7,6 și o placă cu geloză-sînge 5—10%, ambele medii proaspete, dar suficient de uscate pentru a nu avea lichide condensate pe suprafață.

O grupă de plăci se expune în mijlocul încăperii de cercetat pe o masă, iar a doua grupă se expune într-un colț al încăperii, de asemenea, la înălțimea unei mese.

Expunerea se face prin ridicarea capacelor cutiilor Pétri și așezarea lor, cu deschiderea în jos, alături de plăcile cu mediu care sînt expuse, astfel, germenilor din aer.

Din momentul ridicării capacelor, timpul de expunere este strict cronometrat, cutiile Pétri urmînd a fi lăsate deschise 5, 10 sau 15 min, în funcție de încărcătura microbiană bănuită în aer. (La încărcătura microbiană mare, timpul de expunere este redus.)

Este recomandabil ca recoltarea să se facă în perioada de maximă activitate a zilei, iar timpul de expunere să fie uniformizat la 10 min, după care capacul se reasază pe cutie.

Toate cutiile cu recoltări se termostatează la 37°C, timp de 24 h, pentru geloză-sînge și încă 24 h, la temperatura camerei, pentru geloză simplă. Concomitent, se incubează și plăci-martor cu medii preparate din același lot, dar care nu au fost expuse.

Prin acest control se urmărește numărul total de germeni pe m³ aer și numărul de germeni hemolitici pe m³ de aer.

Numărul de germeni se stabilește prin numărarea coloniilor crescute pe suprafața gelozei simple, iar *numărul germenilor hemolitici* prin coloniile cu zonă de hemoliză, dezvoltate pe geloză-sînge. Plăcile martor folosite pentru verificarea sterilității mediilor utilizate nu trebuie să prezinte colonii.

În sălile de intervenții chirurgicale și în saloanele de nou-născuți și sugari nu se admite prezența de stafilococi și streptococi patogeni.

20.4. CONTROLUL MICROBIOLOGIC AL SUPRAFETELOR ȘI INVENTARULUI MOALE

Controlul microbiologic al suprafețelor și al inventarului moale este un mijloc de apreciere a stării de curățenie din unitatea sanitară. Prelevările de probe se fac de pe suprafața pereților, de pe mese, tăbliile paturilor, pături, cearșafuri etc. Dacă pentru curățirea suprafețelor respective, în afara detergenților uzuali, a fost folosit vreun dezinfectant, ele vor fi stropite, înainte de recoltare, cu un neutralizant; soluție n/10 de tiosulfat de sodiu pentru clor sau o soluție 2% de amoniac pentru formol.

Fiecare probă se recoltează cu un tampon de vată hidrofobă, umezită înainte de folosire cu 1 ml apă peptonată 1%. Cu acest tampon se șterge o suprafață delimitată de un șablon metalic pătrat, cu latura interioară de 5 sau 10 cm, sterilizat prin flambare, chiar la locul recoltării. Ștergerea suprafeței se face trecîndu-se tamponul de 2—3 ori în sensuri diferite, cu rotirea lui concomitentă pe toată suprafața delimitată de șablon (25 cm² sau 100 cm²).

Pentru a se preveni uscarea tampoanelor, însămînțarea se va face în cel mult 2 h după recoltare. La fiecare tampon se adaugă 9 ml apă peptonată 1%. După un repaus de 10—15 min, se agită puternic, pentru omogenizarea concentrației bacteriene, obținîndu-se suspensia brută de lucru. La controlul dezinfecției suprafețelor și al inventarului moale se cercetează: numărul total de germeni pe cm², prezența *b. coli*, a stafilococului hemolitic și a *b. proteus*.

Pentru determinarea numărului de germeni din suspensia brută se mai face o diluție 1/10 în apă peptonată 1%. Atît din suspensia

brută, cât și din diluția zecimală, se vor încorpora câte 1 ml în geloză 2% topită și răcită la 45—50°C, turnată în cutii Pétri.

După 48 h de incubație se numără coloniile dezvoltate pe cele două plăci ale fiecărei probe (suspensia brută și diluția zecimală).

Pentru determinarea prezenței *B. coli* se însămânțează 2 ml din diluția brută în bulion lactozat, cu tub de fermentație Durham, după 48 h făcându-se treceri pe mediile Levin, Drigalski sau Mac Conkey și confirmări biochimice pentru tuburile care au fermentat lactoza cu producere de gaz. Coloniile de *b. coli* vor fi studiate și din punctul de vedere al patogenității.

Pentru *B. proteus* se însămânțează 1 ml din diluția brută la baza unei geloze înclinate, urmărindu-se apariția fenomenului de „cătărăre” caracteristic.

Pentru determinarea prezenței stafilococului hemolitic se amestecă 2—3 ml din suspensia brută, în părți egale, cu mediul lichid hiperclorurat. După 24 h, la 37°C, se fac treceri pe mediile Chapman (solid) și geloză-sînge 5—10%. La coloniile de stafilococ hemolitic dezvoltate, se vor studia caracterele de patogenitate (coagularea, fibrinolizina, enterotoxicitatea).

20.5. CONTROLUL UTILAJULUI DIN BLOCURILE ALIMENTARE

Controlul microbiologic al veselei, tacîmurilor și utilajelor folosite la pregătirea, transportul și servirea mesei în spital poate da indicații asupra măsurilor preventive împotriva infecțiilor cu cale de pătrundere digestivă.

Controlul se face la bucătăria spitalului, precum și la oficiile și saloanele din spital.

Pentru recoltări se folosesc tampoane de vată hidrofobă, umezite înainte de folosire cu 1 ml apă peptonată 1%. Pentru fiecare obiect se folosește câte un tampon astfel pregătit, ștergîndu-se insistent, și cu rotirea tamponului, fața internă a vaselor de bucătărie și a veselei, porțiunea uneltelor de bucătărie și a tacîmurilor care vin în contact cu alimentele, buza cănilor și a paharelor (fața internă și externă).

Peste tampoanele de recoltări se adaugă 9 ml apă peptonată 1%. Tamponul se lasă 10—15 min în repaus, după care se agită puternic pentru eliberarea germenilor de pe vată și omogenizarea lor în lichidul de suspensie. Prin controlul microbiologic se urmărește prezența : *B. coli*, *B. proteus* și a stafilococului hemolitic.

Examenele se execută ca la controlul tegumentelor.

20.6. PROFILAXIA INFECȚIILOR INTRASPITALICEȘTI

Pentru neutralizarea surselor de infecție se iau toate măsurile, în scopul depistării cât mai precoce, cu ajutorul laboratorului, a oricărui focar microbial susceptibil de a genera infecții intraspitalicești.

Focarele depistate vor fi lichidate prin tratament adecvat sau, când acest lucru nu este posibil, prin izolarea, supravegherea permanentă și educația sanitară a purtătorilor de germeni. Personalul sanitar și auxiliar purtător de germeni va fi plasat, pînă la sterilizare, în locuri de muncă în care nu vine în contact cu bolnavii.

În ceea ce privește căile de transmite, măsurile profilactice vizează :

— asigurarea unor circuite funcționale corespunzătoare în cadrul spitalului pentru : bolnavi, personalul medico-sanitar și auxiliar, studenți, elevi, practicieni, vizitatori, instrumentar medical, alimente, lenjerie, reziduuri etc. ;

— dezinfecția profilactică periodică ;

— asigurarea asepsiei în intervențiile chirurgicale printr-o sterilizare corespunzătoare a instrumentarului și a materialelor necesare acestor operații ;

— crearea unor deprinderi corespunzătoare de igienă individuală și colectivă.

INFRAMICROBIOLOGIE

Temă 21

GENERALITĂȚI ASUPRA VIRUSURILOR

Inframicrobiologia sau **virusologia** este știința care are ca obiect de studiu cei mai mici agenți infectanți — virusurile sau inframicrobii —, precum și afecțiunile provocate de aceștia.

În ultimul secol, mai ales în ultimele trei decenii, s-au produs mutații notabile în cadrul bolilor infecțioase care afectează omul. Creșterea standardului de viață, îmbunătățirea condițiilor de igienă, dezvoltarea unor mijloace eficiente de profilaxie și combatere a bolilor transmisibile au redus ponderea infecțiilor bacteriene, modificând puțin sau deloc incidența virozelor. De aceea, hepatitele virale, infecțiile virale ale tractului respirator sau ale sistemului nervos central, gastroenteritele virale etc. constituie problemele cele mai importante ale patologiei infecțioase atât la nivel individual, cât și la nivelul întregii comunități.

Virusurile sînt agenți infectanți care se deosebesc radical de ceilalți paraziți ai omului (protozoare, ciuperci, bacterii). Virusurile sînt lipsite de organizare celulară. Ele se pot înmulți numai ca paraziți ai unor structuri vii numite, generic, *gazdă*. În funcție de gazdă, virusurile pot fi : *virusuri patogene pentru bacterii — bacteriofagi* ; *virusuri patogene pentru plante, pentru animalele nevertebrate și pentru animalele vertebrate*. În ultima categorie sînt incluse și virusurile ce provoacă boli la om și la animalele domestice și care constituie obiectul de studiu al **virusologiei medicale**.

În afara virusurilor patogene pentru om, se vor studia și unele afecțiuni determinate de o serie de microorganisme cu proprietăți intermediare între virusuri și bacterii : *micoplasme, rickettsii și chlamidii*. În tabelul 1 sînt sintetizate caracterele definitorii fiecărui microorganism patogen pentru om.

Tabelul 1

Proprietăți ale microorganismelor

Microorganismul	Creștere pe medii sintetice	Înmulțire prin diviziune	Prezența simultană de ADN și ARN	Prezența ribozomilor	Sensibilitate la :	
					anti-biotice	interfe-ron
Bacterii	+	+	+	+	+	—
Micoplasme	+	+	+	+	+	—
Rickettsii	—	+	+	+	+	—
Chlamidii	—	+	+	+	+	+
Virusuri	—	—	—	—	—	+

21.1. CARACTERE GENERALE ALE VIRUSURILOR

Din tabelul 1 subliniem, în primul rând, proprietățile specifice numai virusurilor :

— genomul virusurilor este constituit dintr-un singur fel de acid nucleic, fie acid ribonucleic (ARN), fie acid dezoxiribonucleic (ADN), nicideată ambii ;

— mecanismul de înmulțire este particular virusurilor. Pe matrița genomului viral (ARN sau ADN), purtătoare a informației genetice, se produc numeroase copii (replici) ale virusului infectant inițial. Acest proces în care de la o singură unitate infectantă parentală rezultă numeroși progeni se numește **replicare** ;

— o altă caracteristică a virusurilor este aceea că nu se pot cultiva pe medii artificiale, lipsite de viață. Ele se replică numai în organisme sau celule vii.

La aceste proprietăți ale agentului infectant viral se adaugă o serie de particularități ale infecției virale, adică ale relației virus-gazdă :

— deși în majoritatea infecțiilor virale întregul organism este afectat, numai anumite celule semnalează replicarea virală prin apariția unor structuri cu afinitate tinctorială modificată numite **incluzii** ;

— imunitatea în viroze este de lungă durată, în așa fel încât, de regulă, nu se produc la același organism infecții repetate cu un virus. Substratul celular al răspunsului imun este elementul esențial al acestei rezistențe specifice de durată. Savanții români C. Levađiti și Șt. S. Nicola u au semnalat printre primii această particularitate. Și răspunsul inflamator nespecific este deosebit în viroze, predominând infiltratul cu celule limfomonocitare. În bacterioze imunitatea este trecătoare, substratul său fiind sinteza anticorpilor specifici răspunsul inflamator este dat de infiltratul cu celule polimorfonucleare ;

— antibioticele nu au efect în viroze. Terapia acestor infecții constă în utilizarea unor chimioterapice și, mai ales, a unor substanțe sintetizate de gazdele infectate numite, generic, **interferoni**.

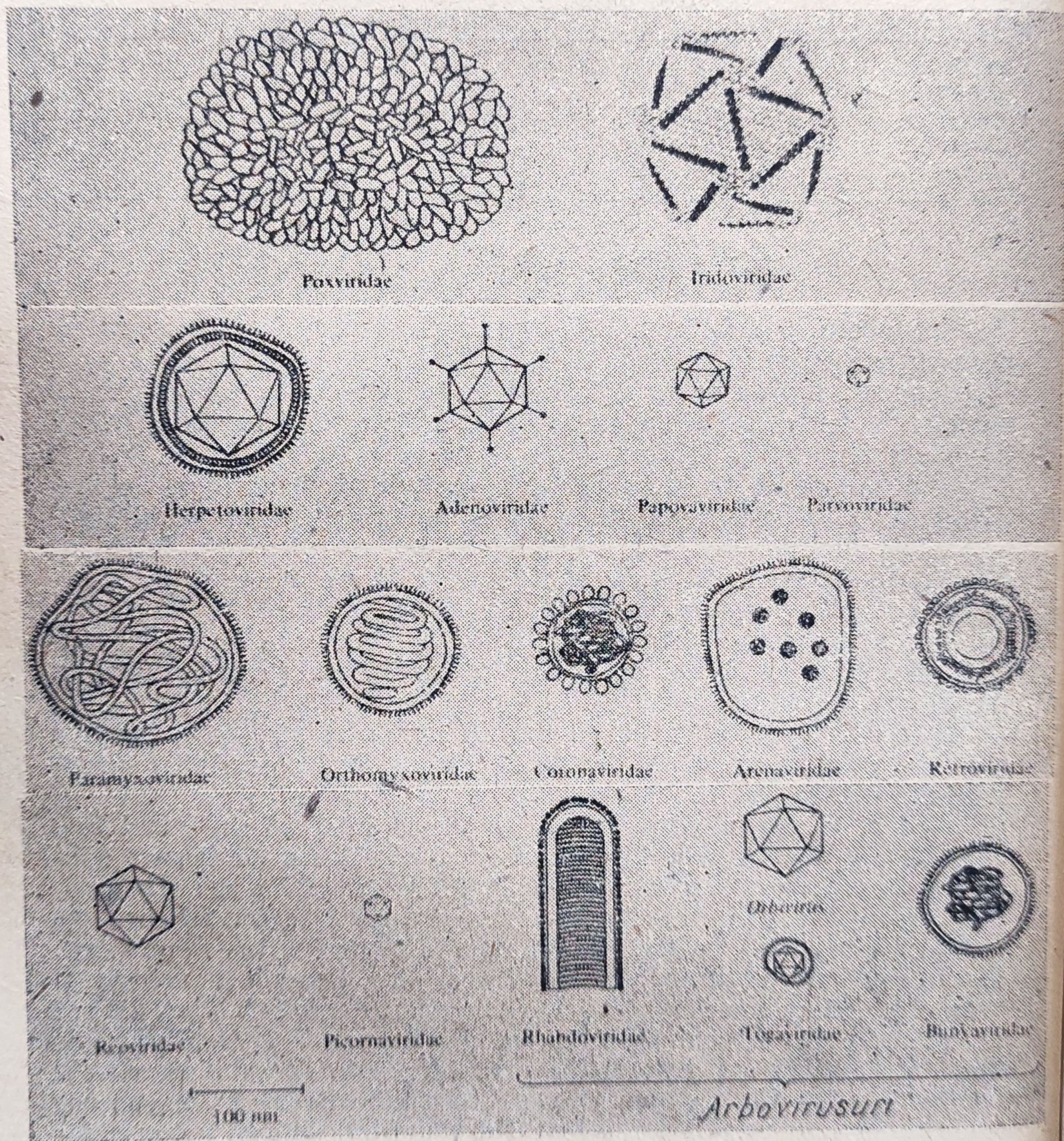


Fig. 12. Diagramă ilustrând morfologia și dimensiunile principalelor familii de virusuri animale.

21.2. CLASIFICAREA VIRUSURILOR

Clasificarea modernă a virusurilor ține seamă de morfologia particulelor virale și de compoziția lor chimică. Figura 12 și tabelul 2 ilustrează morfologia și dimensiunile principalelor clase de virusuri animale. De reținut este existența a două grupe mari de virusuri: **ribovirusuri** și **dezoxiribovirusuri**, cu genomul alcătuit din ARN, respectiv ADN. Această împărțire corespunde unei modalități diferite de replicare a genomului viral.

Tabelul 2

Clasificarea virusurilor animale

Familia	Forma virionului	Diametrul virionului (nm)	Prezența anvelopei	Simetria	Număr capsomere	Număr proteine
<i>-virusuri ADN</i>						
Parvovirusuri	S	20	—	I	32	3
Papovavirusuri	S	45—55	—	I	72	6
Adenovirusuri	S	70—80	—	I	256	9
Herpesvirusuri	S	150	+	I	162	12—24
Poxvirusuri	P	300	—	—	—	30
<i>-virusuri ARN</i>						
Picornavirusuri	S	20—30	—	I	60	4
Togavirusuri	S	40—60	+	I	?	3
Bunyavirusuri	S	90—100	+	H	—	3
Arenavirusuri	S	85—120	+	H	—	3
Coronavirusuri	S	80—120	+	H	—	16
Retrovirusuri	S	100—120	+	H	—	8
Ortomixovirusuri	S—F	80—120	+	H	—	7
Paramixovirusuri	S—F	100—120	+	H	—	6
Rhabdovirusuri	glonț	70—180	+	H	—	7
Reovirusuri	S	50—80	—	I	?	7

Notă : Simbolurile au următoarea semnificație :

S = sferic ; *P* = paralelipipedic ; *F* = filamentos ; *I* = icosaedric ; *H* = helioidal ; ? = proprietate necunoscută.

Unitatea de măsură pentru diametru este nanometrul (nm) ; 1 metru = 1 000 (10³) milimetri = 10⁶ microni = 10⁹ nanometri.

21.3. METODE DE LUCRU FOLOSITE ÎN INFRAMICROBIOLOGIE

Diagnosticul virusologic constituie scopul căruia îi este subordonată întreaga metodologie folosită în virusologia medicală. Izolarea agentului cauzal, diagnosticul histologic și la microscopul electronic, ca și diagnosticul serologic sînt cele trei direcții ale diagnosticului modern în virusologie.

Pentru izolare, produsele patologice recoltate de la bolnav se pot inocula în unul din următoarele sisteme-gazdă : animalul de experiență, oul de găină embrionat și culturile de celule. Etapele următoare ale diagnosticului vizează fie identificarea agentului fie, în cazul animalului de experiență, evidențierea răspunsului imun specific.

Temă 22

MORFOLOGIA, STRUCTURA ȘI COMPOZIȚIA CHIMICĂ A VIRUSURILOR

Unitatea structurală elementară în virusologie este denumită *virion*, fiind constituită din *acidul nucleic viral* și învelișul proteic sau *capsida virală*. Învelișul proteic stabilizează acidul nucleic care poate, astfel, supraviețui extracelular. Învelișul proteic facilitează atașarea și penetrarea virusului în celula-gazdă și conferă specificitatea imunologică fiecărui tip de virus.

Dimensiunea virionilor este infimă, deci vizualizarea lor nu poate fi realizată decât cu microscopul electronic. Pentru comparație, diametrul virusului poliomieltic este de 20—30 nm, al virusului gripal de 100—200 nm, iar al stafilococului de 1 000 nm.

Forma virionilor este variabilă : *sferică* sau *ovoidă*, cel mai frecvent ; *filamentoasă*, *paralelipipedică*, în cazuri aparte.

22.1. STRUCTURA INTERNĂ A VIRIONULUI

Centrul virionului este ocupat de acidul nucleic care conține informația genetică necesară replicării virale. Acidul nucleic poate fi simplu sau dublu spiralat, liniar sau circular. Numărul de gene, respectiv numărul de proteine virale codificate, variază larg între diferitele clase de virusuri. De exemplu, enterovirusurile codifică numai 4 proteine, în timp ce virusul herpetic în jur de 150.

Capsida virală este alcătuită din unități morfologice numite *capsomere*. Capsomerele, la rândul lor, conțin molecule proteice individuale. Aranjarea capsometrelor corespunde unei simetrii stricte. Virusurile animale sînt edificate în două forme de simetrie : elicoidală (de exemplu, virusul gripal, fig. 13) și cubică sau icosaedrică (de exemplu, adenovirusurile, fig. 14). În fiecare caz, dispoziția simetrică

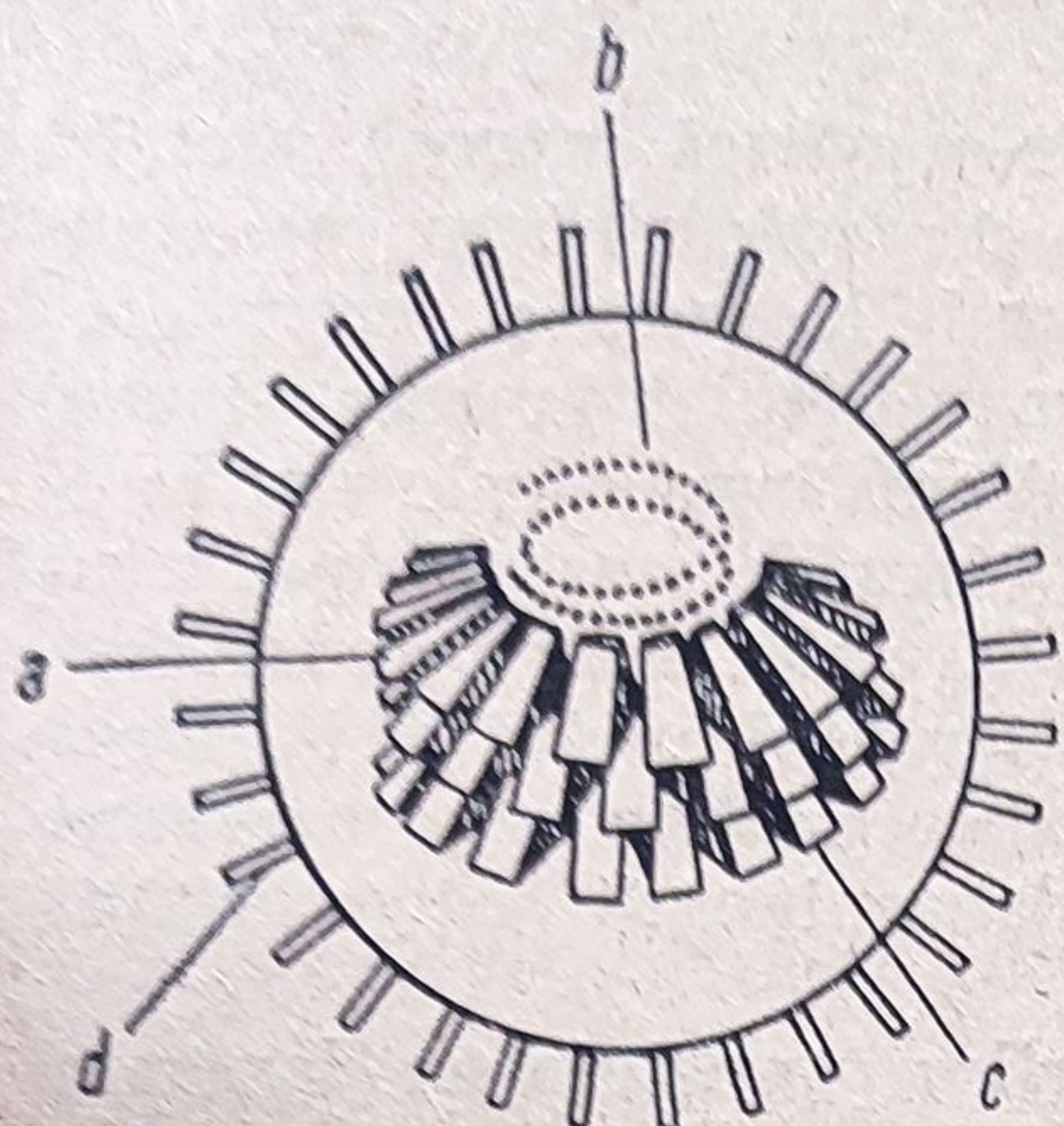


Fig. 13. Virus cu simetrie elicoidală :

a — nucleocapsidă ; b — acid nucleic viral ; c — capsomere ; d — anvelopă.

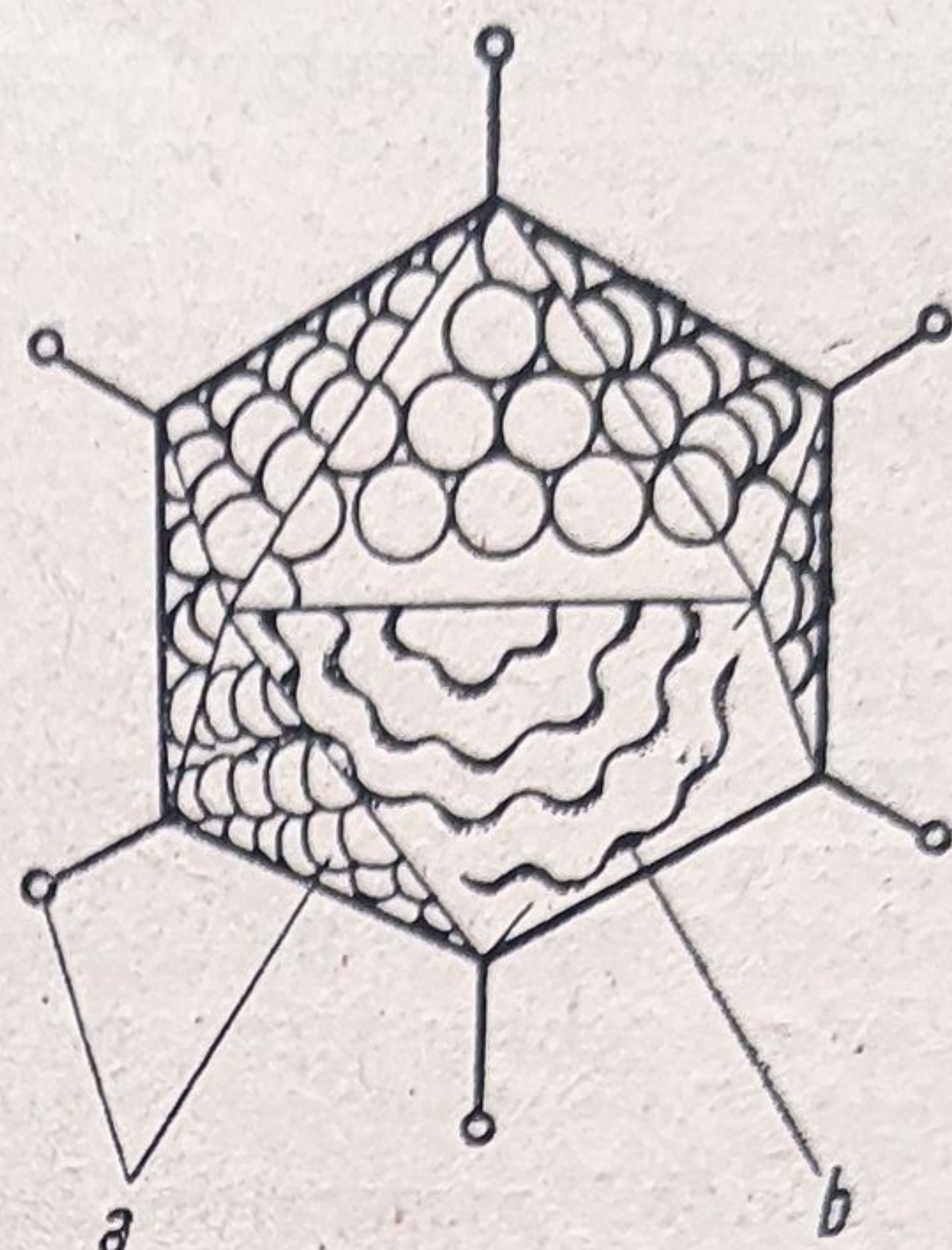


Fig. 14. Virus cu simetrie cubică :

a — capsomere ; b — acid nucleic viral.

a structurilor interne ale virionului are ca rol de a cuprinde într-un volum minim o structură cât mai stabilă.

Pericapsidar, la unele familii de virusuri există un al doilea înveliș alcătuit din elemente specifice virusului, cât și din structuri proprii celulei-gazdă, în care acesta s-a replicat. Acest înveliș se numește *anvelopă*.

22.2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A VIRUSURILOR

Un pas preliminar esențial în analiza chimică a virusurilor îl constituie izolarea lor de structurile celulei în care s-au multiplicat. Acizii nucleici virali sînt ușor de separat, întrucît compoziția lor în baze azotate diferă în ceea ce privește proporțiile relative ale bazelor atît de la o familie de virus la alta, cît și între acizii nucleici virali și cei celulari.

Proteinele reprezintă elementul chimic esențial din compoziția capsidei virale. Fiecare capsomer conține unul sau mai multe lanțuri polipeptidice asamblate prin legături noncovalente. Modul specific de asamblare a capsomerelor face aceste structuri greu atacabile de către enzimele de digestie proteică. Majoritatea proteinelor virale sînt structurale ; există, însă, și proteine cu rol enzimatic. O enzimă recent descoperită, *reverstranscriptaza virală*, este indispensabilă pentru a iniția infectivitatea acizilor nucleici. Rolul acestei

enzime este deosebit în cazul unor virusuri care contribuie la transformarea malignă a celulelor normale.

Anvelopa virală este constituită dintr-o pătură internă proteică și o pătură externă lipoproteică. În timp ce stratul intern este codificat exclusiv de genomul viral, complexul lipoproteic extern conține și structuri care derivă din membrana celulei în care virusul s-a replicat. De regulă, în stratul extern al anvelopei virale sînt inserate structuri glicoproteice codificate de virus (hemaglutinina, neuraminidaza). Aceste inserții apar ca proiecții sau „țepi” pe suprafața virionului. Rolul lor este deosebit în atașarea virusului și inițierea infecției. Proiecțiile constituie, pe de o parte, replica unor receptori celulari pentru virus, pe de altă parte, determinanții antigenității virale.

Studiul compoziției chimice a virusurilor constituie un domeniu cu largi implicații practice. Pe această bază s-a dezvoltat producția de vaccinuri virale, care, într-un viitor apropiat, va da o eficiență sporită profilaxiei specifice a virozelor.

T e m a 23

ACȚIUNEA AGENȚILOR FIZICI ȘI CHIMICI ASUPRA VIRUSURILOR

Cunoștințele asupra agenților fizici și chimici care inactivează infectivitatea virionilor constituie baza teoretică a antisepsiei și dezinfecției virale. În același timp, prin conducerea procesului de inactivare în astfel de condiții încît pierderea infectivității să nu fie însoțită de alterarea antigenității, se creează premisele preparării vaccinurilor virale inactivate.

23.1. AGENȚI FIZICI ȘI CHIMICI

1. **Temperatura.** Încălzirea unei suspensii virale timp de 30 min, la 50—60°C, scade sensibil sau chiar abolește infectivitatea. Sînt, totuși, cîteva excepții importante care trebuie reținute: virusurile hepatitei epidemice nu pot fi inactivate în acest mod. Pentru a evita riscul transmiterii acestei boli grave, instrumentarul medical trebuie sterilizat numai prin fierbere prelungită și, preferabil, sub presiune, în autoclav.

Frigul, temperatura sub $-20 \dots -30^{\circ}\text{C}$ conservă infectivitatea. Decongelările repetate pot, însă, în multe cazuri, inactiva virusurile. O metodă de conservare a mării majorități a virusurilor este liofilizarea, adică deshidratarea unor suspensii virale înghețate prin sublimare în vid.

2. **pH-ul și osmolaritatea.** În mediu acid (sub $\text{pH} = 5$) sau alcalin (peste $\text{pH} = 9$), virusurile sînt inactive. Osmolaritatea, mai ales prezența anumitor săruri în concentrații molare, stabilizează infectivitatea unor virusuri. De exemplu, clorura de magneziu termostabilizează virusurile poliomielitice și, în același timp, duce la inactivarea unor eventuale virusuri contaminate ale vaccinului poliomielitice.

3. **Radiațiile.** Razele ultraviolete, roentgen, gamma inactivează virusurile. Doza necesară variază în funcție de dimensiunile virusurilor considerate. Unii coloranți, complexîndu-se cu structurile virale, în special cu acizii nucleici virali, le sensibilizează la expunerea la lumină, fenomen numit *inactivare fotodinamică*.

4. **Eterul și alți solvenți lipidici.** Susceptibilitatea la eter este o proprietate care permite diferențierea virusurilor ce posedă un înveliș pericapsidar bogat în lipide. Următoarele virusuri sînt rapid inactivate de eter : herpetic, gripal, rujeolos, urlian. Virusurile poliomielitice și adenovirusurile rezistă la eter. Un corolar al sensibilității la solvenți lipidici este distrugerea virusurilor în urma expunerii la bilă în tractul digestiv.

5. **Glicerina.** Aceasta are o acțiune de distrugere a bacteriilor, în timp ce majoritatea virusurilor (rabic, vaccinal) pot fi conservate în glicerină 50%.

6. **Antisepticele.** Virusurile fără anvelopă sînt rezistente la mulți agenți dezinfectanți (clor, alcool, formol). De exemplu, clorinarea apei nu reușește totdeauna să distrugă virusurile *hepatice*, sau enterovirusurile. Ozonul, hipocloritul de sodiu și alte substanțe oxidante sînt eficiente în dezinfecția virală, dar aplicarea lor nu este lipsită de efecte secundare nocive. Este însă necesar să se găsească substanțe suficient de active pentru a fi folosite în dezinfecția de rutină.

23.2. MODUL DE ACȚIUNE ASUPRA VIRUSURILOR

Mecanismul prin care unii agenți fizici sau chimici abolesc infectivitatea virală este diferit în funcție de următorii parametri : concentrația agentului, durata de expunere, prezența unor stabilizatori (proteine, zaharuri) sau, dimpotrivă, a unor substanțe sensibilizante (coloranți) în mediul de diluție al virusului, structura viru-

sului etc. De obicei, acțiunea se realizează după principiul „țintei”, adică al realizării unei concentrații suficiente per/particulă. Deci, suspensiile virale mai concentrate sînt, proporțional, mai sensibile decît cele mai diluate.

Antimetaboliții — substanțe chimioterapice — nu acționează, ca ceilalți agenți fizici sau chimici, prin denaturarea acizilor nucleici sau proteinelor virale. Ei interferează cu mecanismele replicării virale în celulă. În situația ideală, această interferență n-ar trebui să afecteze și metabolismul celulei-gazdă. Astăzi, datorită cunoștințelor de biologie moleculară, au fost precizate etapele critice ale replicării virale în care acțiunea chimioterapicelor este fără consecințe pentru metabolismul celular. Numai substanțele care acționează în acest mod sînt utile în clinică.

Te m a 24

CULTIVAREA VIRUSURILOR

Deși cultivarea virusurilor rezolvă o seamă de probleme teoretice legate de replicarea virală, consecințele practice sînt mult mai importante, reflectîndu-se în diagnosticul virusologic. Astăzi există metode rapide de cultivare și identificare a virusurilor. Pentru un diagnostic rapid trebuie avute în vedere următoarele elemente: *recoltarea produselor patologice de la bolnav de la nivelul sediului preferențial al replicării virale; opțiunea pentru cele mai potrivite sisteme-gazdă de cultivare a virusurilor; alegerea metodelor de identificare cele mai specifice și sensibile.*

24.1. RECOLTAREA, PRODUSELOR PATOLOGICE DE LA OM

Probabilitatea succesului în ceea ce privește izolarea și cultivarea virusurilor este dependentă de faza de boală și de produsul recoltat (v. tab. 3).

Din tabel rezultă că produsele recoltate în perioada de debut a bolii conduc frecvent la izolarea virusurilor implicate în infecția respectivă. Produsele patologice trebuie transportate cît mai curînd la laborator în vederea inoculării. Recoltarea se face cu respectarea regulilor de sterilitate bacteriologică, iar transportul trebuie făcut la rece sau în stare congelată. Adăugarea de antibiotice este utilă, întrucît previne suprainfecția bacteriană.

Relația stadiu de boală — frecvența izolării virale — prezența anticorpilor specifici

Stadiul de boală	Virus detectat în produse patologice	Prezența anticorpilor specifici
Incubație	foarte rar	absentă
Prodrom	frecvent	absentă
Faza acută	foarte frecvent	ocazională
Vindecare	rar	obișnuită
Convalescență	foarte rar	obișnuită

Dintre produsele patologice recoltate în vederea izolării, se menționează următoarele :

— **Sîngele** se recoltează prin puncție venoasă. Deoarece suportul vehiculării majorității virusurilor în torentul sanguin îl constituie leucocitele, se recomandă separarea acestor celule și inocularea lor. În plus, există tehnici rapide de evidențiere a prezenței virusurilor în leucocite prin imunofluorescență.

— **Secrețiile nazo-faringiene** se recoltează prin spălături sau cu tampon steril, de obicei dimineata, înainte efectuării toaletei bucale. Acestea sînt produsele de elecție pentru izolarea virusurilor implicate în infecțiile respiratorii sau în virozele eruptive cu transmiterea aerogenă (rujeolă, rubeolă, mononucleoză etc.).

— **Secrețiile conjunctivale**, recoltate cu ansa, tampon steril sau spălătură, sînt utile în diagnosticul trahomului, conjunctivitelor cu incluzii și al unor adenoviroze.

— **Veziculele** sau alte leziuni cutanate (papule, pustule, cruste) și mucoase sînt puncționate sau raclate cu o pipetă Pasteur fin efilată. Lichidul extras sau crustele servesc pentru izolări în herpes, variolă, varicelă.

— **Urina** poate servi la demonstrarea viruriei (prezența virusului în urină) în cazul multor viroze eruptive, dar mai ales în cursul infecției citomegalice.

— **Materiile fecale** servesc pentru izolarea enterovirusurilor care sînt implicate într-o gamă largă de afecțiuni, de la enterite la meningite și paralizii.

— **Biopsiile** prelevate prin puncții sau chirurgical, ori fragmentele de organ recoltate postmortem servesc diagnosticului virusologic în multe situații. Se prelevează ganglioni limfatici, mucoasă respiratorie sau digestivă, plămîn, țesut cerebral etc. De reținut că fragmentele recoltate bioptic pot servi, uneori, la inițierea de culturi celulare, caz în care procentul izolărilor crește sensibil. Pentru acest

scop probele nu vor fi înghețate, ci păstrate la 37°C și prelucrate cât mai operativ.

În tabelul 4 sînt date indicații asupra modului de alegere a produsului patologic în vederea izolării în cele mai frecvente afecțiuni virale.

Tabelul 4

Produse patologice recoltate pentru izolări de virus

Manifestări clinice	Agentul viral incriminat	Produsul patologic recoltat :	
		de la bolnav	de la cadavru
Afecțiuni ale tractului respirator superior	adenovirusuri reovirusuri enterovirusuri	spălătură nazofaringiană (SNF)	—
Afecțiuni ale tractului respirator inferior	virusuri gripale, micoplasme	SNF, spută	plămîn
Afecțiuni cutanate : — cu vezicule — cu exanteme	variola, varicelă, herpes, rujeolă, rubeolă	lichid din vezicule, sînge, urină	splină, creier, plămîn
Afecțiuni ale sistemului nervos central	enterovirusuri arbovirusuri turbare	sînge, SNF, salivă, lichid cefalorahidian (LCR)	creier, măduva spinală
Boli congenitale ale nou-născutului	rubeolă, virus citomegalic	placentă, urină	corneea, creier, rinichi etc.

24.2. CULTIVAREA VIRUSURILOR PE ANIMALE DE LABORATOR

Animalele de laborator folosite mai frecvent în virusologie sînt : *șoarecele alb, șobolanul, cobaiul, iepurele, hamsterul, maimuța și cocoșul.*

Animalele sînt folosite drept gazdă pentru cultivarea virusurilor în cîteva situații : cînd virusurile nu se cultivă în alte sisteme (exemplu : virusurile hepatitice pe maimuțe) ; cînd boala experimentală produsă la animal constituie un bun model de studiu pentru boala umană (exemplu : keratita herpetică la iepure) ; pentru producerea serurilor imune specifice (animalele frecvent folosite sînt iepurele,

calul, capra); pentru prepararea unor vaccinuri virale (exemplu: vaccinul antivariolic la vițel).

Progresele medicinei veterinare nu au rămas fără răsunet în metodologia lucrului cu animalele de laborator. Astfel, se aplică astăzi criterii științifice în hrănirea și îngrijirea animalelor, principii genetice în reproducere, condiții sterile de creștere.

24.3. RECOLTAREA MATERIALELOR DE LA ANIMALELE DE LABORATOR INOCULATE

În funcție de sediul replicării virale, de la animalele inoculate se pot recolta: *sînge*, *limfă* din vezicule, *lichid peritoneal* sau *pleural*, *organe de la cadavre* sau, în cazuri deosebite, de la animale vii adormite cu eter (de exemplu, extirparea testiculelor în diagnosticul unor rickettsioze). Sîngele se recoltează prin puncție venoasă sau cardiacă. Puncția venoasă este efectuată în diferite regiuni: plica inghinală la maimuțe, vena humerală (a aripiei) la păsări, vena dorsală a cozii sau sinusul orbital la șoarece, vena marginală a urechii la iepure ș.a.m.d.

În general, probele recoltate sînt în funcție de viroza suspectată și sînt aceleași ca pentru bolile umane (v. tab. 4).

Utilizarea animalelor în laboratorul virusologic are în prezent o pondere mai redusă, întrucît celelalte două sisteme: **oul de găină embrionat** și, mai ales, **culturile de celule** oferă avantaje practice și economice. În tabelul 5 sînt reproduse cîteva sisteme virus-animal gazdă curent folosite.

Tabelul 5

Diagnostic virusologic pe animale de laborator

Viroza	Produsul recoltat de la bolnav	Animalul de inoculat	Calea de inoculare	Organul de testat pentru prezența virusului
Encefalomielite virale	sînge, creier	șoarece	intracerebral	creier
Variolă-vaccină	limfă veziculară, fecale, SNF, LCR	iepure șoarece	subcutan subcutan	piele mușchi
Enteroviroze Febră aftoasă	afte din piele	nou-născut cobai	subcutan în labă	piele mușchi

24.4. CULTIVAREA VIRUSURILOR PE OUĂ EMBRIONATE

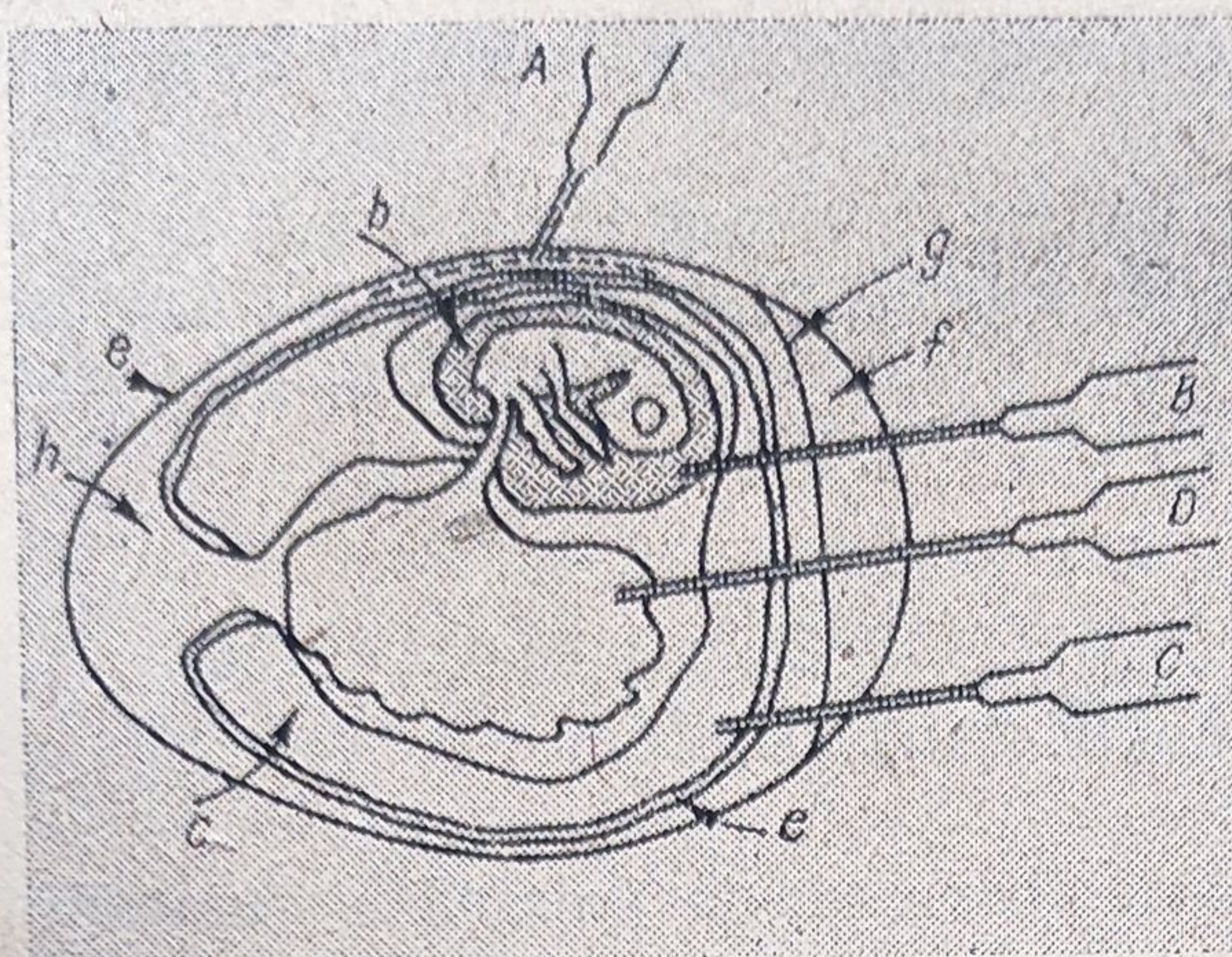


Fig. 15. Căile de inoculare pe oul de găină embrionat :

A — inocularea pe membrana corioalantoidiană (a); B — inocularea intraamniotică, amnios (b); C — inocularea intraalantoidiană, cavitatea alantoidiană (c); D — inocularea intravitelină; e — coaja; f — sac de aer; g — membrana cojii; h — albuș.

Ouăle embrionate de găină sau de la alte specii: rațe, prepelițe pot fi inoculate pe mai multe căi. După inoculare ouăle sînt reîncubate cîteva zile și ținute sub observație. Virusurile gripale sînt cel mai frecvent cultivate pe ouă embrionate, după inoculare intraamniotică sau intraalantoidiană. Același sistem servește pentru prepararea vaccinului gripal. În figura 15 sînt indicate, schematic, structurile la nivelul cărora se inoculează virusurile în oul de găină embrionat; tabelul 6 reproduce elemente ale diagnosticului virusologic pe oul de găină embrionat.

Tabelul 6

Diagnostic virusologic pe oul de găină embrionat

Agentul de izolat	Calea de inoculare	Vîrsta embrionului (zile)	Structurile de testat pentru prezența virusului și criteriul cultivării
Virusuri gripale	intraamniotic	7— 8	lichid amniotic, alantoidian/hemaglutinare
Variolă-vaccină	membrana corioalantoidiană (MCA)	10—12	membrana corioalantoidiană (MCA)/pustule
Ornitoză trahom	intravitelin	3— 5	embrion/moartea embrionului

24.5. RECOLTAREA DIFERITELOR COMPONENTE ALE OULUI EMBRIONAT

După dezinfecție cu tinctură de iod, coaja oului este îndepărtată la nivelul camerei de aer cu ajutorul unui foarfece steril. Această manevră expune suprafața ectodermică a membranei corioalantoi-

diene la nivelul căreia pot apărea leziuni. Membrana este colectată într-o cutie Pétri cu ser fiziologic steril și examinată din nou pe fond întunecat. Pentru alte virusuri sediul replicării este embrionul, care trebuie recoltat în întregime. Lichidele amniotice și alantoidian servesc ca sursă de virus în cazul inoculării virusurilor gripale.

24.6. CULTIVAREA VIRUSURILOR PE CULTURI DE CELULE

Culturile de celule constituie o tehnologie modernă în care celule animale sau vegetale sînt cultivate pe perete de sticlă sau suspendate în mediu nutritiv. Ele reprezintă substratul cel mai larg utilizat în prezent pentru cultivarea virusurilor. Culturile de celule pot fi utilizate într-una din următoarele variante :

- *culturi staționare*, în care un monostrat de celule acoperă una din fețele interne ale unui flacon de sticlă neutră sau plastic ; această față este acoperită de mediul nutritiv ;

- *culturi rotate*, în care monostratul acoperă toată suprafața internă a unui flacon cilindric ce se rotește cu viteză mică, astfel încît mediul nutritiv să scalde periodic toată suprafața monostratului ;

- *culturi în suspensie* sau *pe suport în suspensie*, variantă care asigură o concentrație mare de celule în mediu și, totodată, obținerea unor suspensii virale concentrate ;

- *culturi de organ*, în care microfragmente de organ își mențin arhitectura originală și funcțiile cîteva zile sau săptămîni „in vitro”. Unele virusuri respiratorii sau digestive nu pot fi cultivate decît în asemenea sisteme.

Mediile nutritive ale culturilor de celule conțin soluții saline tamponate și o serie de factori necesari creșterii și menținerii viabilității celulelor : aminoacizi, vitamine, glucoză și, în mod obligatoriu, ser proaspăt de animal (vițel, cal).

Înmulțirea virusurilor în culturi de celule se recunoaște prin următoarele mijloace :

- observarea modificărilor morfologice ale celulelor inoculate, denumite, generic, *efect citopatic* ;

- interferența virală remarcată în cazul înmulțirii unor virusuri, care nu dau efect citopatic ci împiedică cultivarea unui al doilea virus citopatogen, inoculat ulterior ;

- hemadsorbția — alipirea unor hematii-test la celulele în care virusul se cultivă ;

— imunofluorescența, care permite decelarea prezenței virusurilor cultivate în celule și identificarea lor cu ajutorul serurilor specifice cuplate cu substanțe fluorescente.

Tema 25

MULTIPLICAREA VIRUSURILOR

Virusurile se multiplică într-un mod cu totul diferit de bacterii. Ele se autoreproduc numai în celule vii, de unde-și iau materiile nutritive, enzimele și energia necesară multiplicării. Acidul nucleic viral conține informația genetică ce convertește substratul morfologic și echipamentul enzimatic al activității metabolice celulare în direcția sintezei de noi virioni.

Imediat după infecția experimentală virusul inoculat nu mai poate fi recuperat : este *faza de eclipsă* a infecției. În momentul de-

tectării progenilor virali (virionii ,nou sintetizați), debutează *faza logaritmică* a replicării virale. Obişnuit, se mai descriu : *faza de latență*, care se suprapune peste *faza de eclipsă*, și intervalul din *faza de latență* în care progenii sînt găsiți numai intracelular nu și eliberați din celule ; *faza logaritmică* se continuă cu *faza de echilibru* sau *de stare*, în care există o cantitate constantă de virus. Producția de virus intră în declin o dată cu epuizarea substratului celular (fig. 16).

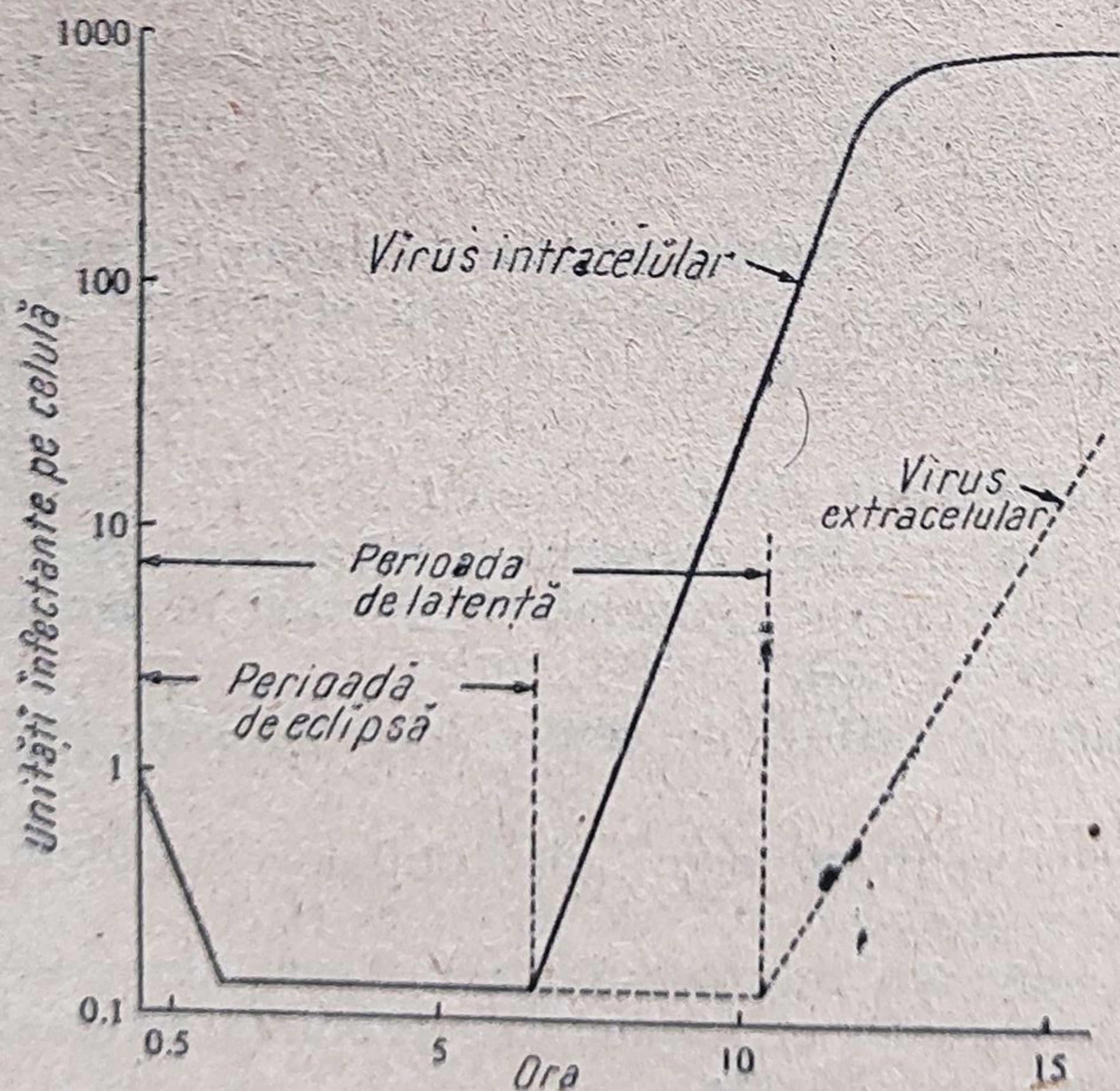


Fig. 16. Diagramă reprezentând ciclul de multiplicare al virusurilor animale.

25.1. FAZELE DE MULTIPLICARE ALE BACTERIOFAGILOR ȘI ALE VIRUSURILOR ANIMALE

Lămurirea fazelor replicării virale la nivel molecular a fost posibilă prin aplicarea unei metodologii complexe și utilizarea inițială a sistemului bacterie — fag (virus bacterian). Multiplicarea virusurilor animale urmează aceleași etape ca și multiplicarea bacteriofagilor (fig. 17), și anume :

- adsorbția virusului la celula-gazdă pe receptori celulari ;
- penetrarea printr-un mecanism asemănător fagocitozei ;
- decapsidarea sau îndepărtarea intracelulară a capsidei virale ;
- sinteza proteinelor virale timpurii, cu rol enzimatic ;
- sinteza acidului nucleic viral și a proteinelor tardive cu rol, de regulă, structural ;

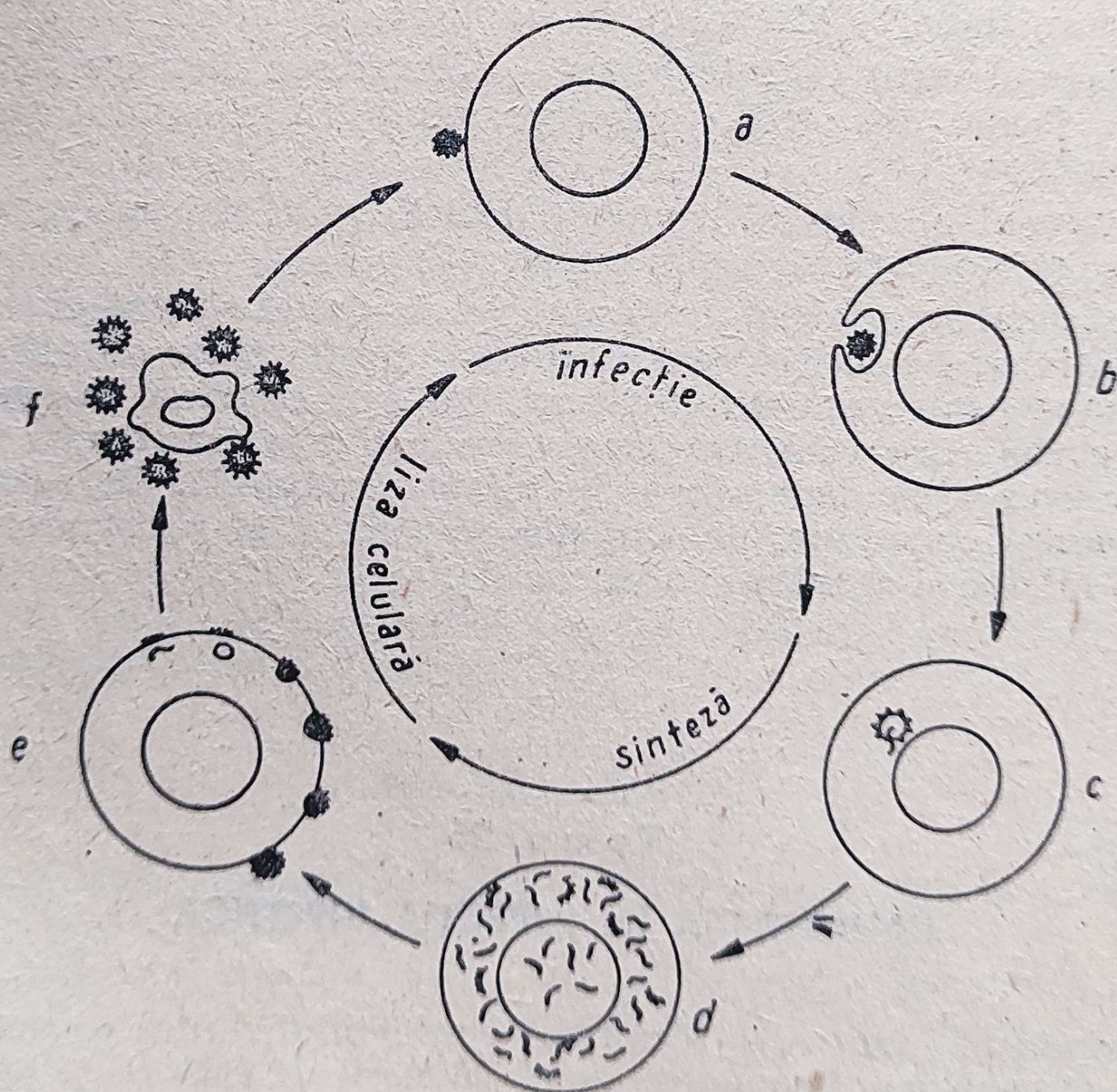


Fig. 17. Etapele multiplicării virale (schemă) :
a — adsorbție ; b — penetrare ; c — decapsidare ; d — replicare ;
e — maturare ; f — eliberarea virionilor progent.

— eliberarea particulelor virale „mature” (asamblate) la nivelul membranei celulare și extracelular.

Etapele se succed pe parcursul câtorva ore, existînd frecvent suprapuneri între faze, dar cu un mecanism de control eficient cantitativ, calitativ și temporal, care asigură producția finală a unor progeni infectanți, întrutotul asemănători parentalilor.

25.2. INTERFERENȚĂ, INTERFERON

Nu sînt rare cazurile în care același substrat celular este infectat cu două sau mai multe virusuri. Deși cele două virusuri se pot replica independent și eficient, frecvent unul dintre ele interferează sau suprimă replicarea celuilalt. **Interferența** se produce cînd infecția cu unul dintre virusuri precede sau este cantitativ net superioară infecției secundare. Mecanismele implicate în interferență pot fi :

— primul virus — *interferent* — ocupă sau distruge receptorii celulari, făcînd imposibilă inițierea replicării virusului secundar sau *interferat* ;

— virusul interferent competiționează unele sisteme enzimactice necesare și replicării virusului interferat ;

— virusul interferent determină celula-gazdă să sintetizeze proteine antivirale — *interferoni*. Acțiunea interferonilor nu este specifică numai pentru anumite virusuri, dar este restrînsă la specia de celule-gazdă care i-au sintetizat. Producția interferonului uman pare a avea reale perspective în terapia antivirală. De asemenea, interferonul constituie un activator important al rezistenței naturale în infecții și apărarea antitumorală.

Tema 26

IMUNITATEA ÎN INFECȚIA VIROTICĂ

Răspunsul imun este rezultatul conflictului dintre organism și virus. Organismul dispune de două categorii de factori de apărare, și anume : unii prezenți înaintea infecției, alții care apar ca răspuns la ea. Primii se încadrează în rezistența nespecifică, iar ceilalți în răspunsul imun.

26.1. MECANISMELE REZISTENȚEI NESPECIFICE

Mecanismele rezistenței nespecifice sînt atribuite ale organismului-gazdă, care intervin în apărarea împotriva oricărui microorganism patogen : virus, bacterie sau parazit de altă natură. În continuare, sînt enumerate cele mai importante dintre ele :

1. **Tegumentul și mucoasele** constituie, prin integritatea lor anatomică și prin secreția unor substanțe chimice, tot atîtea bariere fiziologice aflate la poarta de intrare a virusurilor. De asemenea, acțiune virulicidă are aciditatea sucului gastric sau pH-ul acid, menținut la nivelul unor mucoase de fermentația acidă a florei microbiene saprofite.

2. **Fagocitoza** este o proprietate a celulelor aparținînd sistemului reticuloendotelial (fagocite fixe) sau seriei albe din sînge și limfă (fagocite mobile). Fagocitoza constă în înglobarea și liza microorganismelor parazite, între care și virusurile. De notat că fagocitoza este mult mai eficientă în prezența anticorpilor specifici care sensibilizează (opsonizează) microorganismele parazite la acțiunea fagocitelor. Opsonizarea demonstrează cooperarea dintre factorii specifici și nespecifici ai rezistenței.

3. **Procesul inflamator** constituie un mecanism eficient de limitare a difuziunii infecției. Inflamația debutează cu vasodilatație locală, edem și apoi infiltrație celulară cu mononucleare. Infiltrația celulară este determinată de o proprietate particulară a mononuclearilor : mobilizarea sub influența unor stimuli chimici — *chemotaxie*. Macrofagele mononucleare par să aibă un rol cheie în inițierea altor procese nonimune ale rezistenței. Astfel, ele sînt implicate în sinteza interferonilor, care activează o serie de celule limfocitare cu rol în rezistența nespecifică, pe lîngă acțiunea lor antivirală recunoscută, declanșînd răspunsul imun.

26.2. IMUNITATEA

Imunitatea antivirală implică participarea tuturor resurselor imunologice ale organismului :

— *răspunsul imun umoral*, constînd în sinteza de anticorpi specifici, sinteză efectuată de *limfocitele B* de origine medulară osoasă ;

— *răspunsul imun celular*, constînd în sensibilizarea unor celule capabile de a liza specific virusurile sau celulele parazitare cu virusuri. Acestea sînt, în principal, *limfocite T*, de origine timică.

Cele două categorii de răspuns imun „cooperează” în realizarea rezistenței specifice în viroze. Fiecare categorie cuprinde un *segment aferent*, care realizează recunoașterea antigenului viral și un *segment eferent* sau *efector*, care reprezintă modalitatea directă de acțiune : prin anticorpi, respectiv prin liză celulară.

Imunitatea poate fi dobândită **activ**, consecutiv bolii sau vaccinării, și **pasiv**, prin transfer de anticorpi, transfer realizat transplacental, de la mamă la făt, sau dirijat, de la organismul imun la cel neimun. Tot un transfer de anticorpi dirijat se realizează prin administrarea imunoglobulinelor specifice, metodă utilă în profilaxia multor viroze (exemplu : hepatita, rujeola).

Imunitatea activă este baza rezistenței la reinfecții. Se cunoaște faptul că o viroză a copilăriei, ca rujeola, oreionul sau varicela, este urmată de nesusceptibilitatea la aceste infecții tot restul vieții. Studiul anticorpilor la foștii bolnavi relevă persistența acestora la un nivel cvasiconstant pînă la bătrînețe. Aceasta este situația celor mai multe viroze care dau imunitate pe viață. Alte virusuri, ca agenții infecțiilor respiratorii acute sau ai diareelor acute, produc atacuri repetate. Un număr de factori contribuie la aceste „gripe”, „guturaiuri” sau „diarei” repetate :

- aceste infecții evoluează la nivelul unor membrane localizate (epiteliu respirator sau mucoasă digestivă), solicitînd mai puțin răspunsul imun general ;

- anticorpii serici sînt mai puțin eficienți în neutralizarea virusurilor la poarta de intrare ;

- virozele respiratorii și digestive sînt produse de o mare diversitate de agenți, fiecare cu o specificitate antigenică distinctă. Atacurile repetate sînt datorate infecțiilor cu germeni diferiți.

Răspunsul imun, în special sinteza anticorpilor specifici, constituie baza diagnosticului virusologic prin serologie.

Tema 27

REAȚII SEROLOGICE ÎN INFRAMICROBIOLOGIE

Reacțiile serologice reprezintă volumul cel mai mare al activității laboratoarelor de diagnostic virusologic, ele fiind utilizate și în aprecierea gradului de imunitate al colectivităților în cazul epidemiilor

sau, consecutiv, vaccinărilor în masă. Reacțiile serologice sînt, de asemenea, indispensabile în identificarea unor virusuri recent izolate, în special pentru diagnosticul specific de tip.

Serologia se bazează pe reacția dintre antigen și anticorp. Cantitativ, această reacție se exprimă prin menținerea unuia dintre reactivi constant și diluarea celuilalt. În acest mod se determină titrul reacției. Titrul poate fi semnificativ prin el însuși, mai ales cînd se referă la media titrurilor unor subiecți din aceeași colectivitate. Cînd se studiază însă subiecți izolați care au trecut prin boală, este necesar să se efectueze aceeași reacție serologică pe două probe de ser : prima recoltată la internare, a doua în convalescență. Creșterea titrului anticorpilor antivirali în a doua probă certifică trecerea organismului prin boală.

27.1. REACȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

Reacția de fixare a complementului (RFC) poate fi utilizată pentru diagnosticul majorității virozelor. Informațiile care se obțin sînt specifice de grup și nu pot caracteriza tipul, subtipul sau varianta de virus. De exemplu, toate adenovirusurile au un antigen fixator de complement comun, indiferent de tip ; tulpinile de gripă A și B pot fi diferențiate între ele prin RFC, nu însă tipurile sau variantele de tulpini A_0 , A_1 , A_2 .

Principiul reacției. Acesta este cunoscut din bacteriologie. Există două sisteme antigen-anticorp competitive în legarea complementului :

— *primul sistem este cel investigat* : antigenul viral și serul de diagnosticat ;

— *al doilea este sistemul indicator hemolitic* : hematii de oaie și ser hemolitic — antihematii de oaie.

În cazul în care sistemul de cercetat conține anticorpi specifici antivirali se va forma complexul virus-anticorpi, care va lega și complementul. Hemoliza sistemului indicator nu se mai produce din cauza lipsei complementului liber. Deci, RFC este pozitivă cînd hemoliza nu se produce, și invers. Tehnica reacției este identică cu cea descrisă în partea de bacteriologie.

Interpretare. Deși RFC este foarte larg folosită, trebuie reamintit că prezența anticorpilor indică numai o boală recentă și este de mai mică valoare în aprecierea unei rezistențe specifice de tip obținută în urma unei boli sau unei vaccinări efectuate cu mult timp în urmă. Arbovirusurile (virusurile encefalitice) au o situație de excepție,

întrucît anticorpii fixatori de complement sînt cei mai specifici şi au o valoare diagnostică mai mare decît anticorpii seroneutralizanti sau hemaglutinoinhibanţi.

27.2. REACŢIA DE HEMAGLUTINARE

Unele virusuri au proprietatea de a aglutina hematiile unor specii animale. Structurile moleculare responsabile de această acţiune se numesc **hemaglutinine**. După caracteristicile hemaglutininelor, virusurile se împart în trei grupe :

— *hemaglutinină cantonată la nivelul anvelopei virale*, care aglutinează reversibil hematiile. De exemplu, virusul gripal aglutinează hematii de cocoş, maimuţă, cobai, om etc., reversibil. După un timp, virusul disociază spontan din depozitul eritrocitar (eluează). Virusul eluat îşi păstrează nealterată capacitatea hemaglutinantă, dar hematiile de pe care virusul a eluat nu mai pot fi aglutinate, deoarece au pierdut receptorii specifici membranali ;

— *hemaglutinină separabilă de particula virală*, care aglutinează, de obicei ireversibil, hematiile ; este cazul virusurilor din grupul variolo-vaccinei ;

— *hemaglutinină identică cu virionul*, care realizează în reacţia de hemaglutinare un echilibru reversibil : virioni + hematii neaglutinate \rightleftharpoons complex hematii aglutinate — virus.

1. **Principiul reacţiei.** Reacţia de hemaglutinare (RHA) se efectuează pentru estimarea cantitativă a puterii hemaglutinante a unui antigen (titrarea antigenului), care va fi folosit în reacţia de hemaglutinoinhibare pentru evidenţierea anticorpilor omologi.

2. **Materiale necesare.** Suspensia de hematii, antigenul de titrat, diluantul (ser fiziologic, adesea) şi instrumentarul obişnuit în serologie (pipete gradate, tuburi, plăcuţe cu godeuri) asigură condiţii suficiente pentru efectuarea reacţiei.

3. **Tehnica reacţiei.** O etapă preliminară RHA constă în recoltarea şi pregătirea suspensiei de hematii. Sîngele proaspăt se recoltează pe anticoagulant, apoi hematiile se spală prin centrifugări repetate cu soluţie salină fiziologică tamponată la $\text{pH} = 7,2$. Se fac trei centrifugări la cîte 1 000 rotaţii/min timp de 10 min. Din depozitul de hematii depus la fundul cupei după ultima centrifugare se ia volumul dorit, pentru a se face suspensia de hematii în concentraţia cerută de tehnica reacţiei (v. tab. 7).

Reacția propriu-zisă se execută astfel :

- se fac diluții binare din antigenul de cercetat în volum de 0,25 ml ;
- se adaugă în fiecare tub sau godeu câte 0,25 ml ser fiziologic ;
- se adaugă câte 0,5 ml suspensie de hematii în fiecare tub ;
- se incubează la temperatura indicată pentru fiecare virus.

Tabelul 7

Condițiile reacțiilor de HA-HI la principalele grupe de virusuri

Virusuri	Specia de hematii	Concentrația suspensiei %	Temperatura reacției	Tratamentul serurilor pentru inhibitori nespecfici
Enterovirusuri (numai Coxsakie)	om-grupa 0 (I)	0,4	4° sau 37°C	56°C/30 min și adsorbție caolin
V. gripal (izolat recent), v. paragripal	cobai om cocoș	0,4	T° camerei	56°C/30 min, adsorbție hematii, tratament RDE*
V. gripal (tulpini de laborator), oreion etc.	cocoș	0,5	T° camerei	56°C/30 min, adsorbție hematii, tratament RDE
Rujeolă, adenovirusuri grupa I	maimuță	0,5	37°C	56°C/30 min, adsorbție hematii
Adenovirusuri, grupa II și III	șobolan	0,4	37°C	56°C/30 min, adsorbție hematii

* RDE = enzima care distruge mucoreceptorii (enzimă extrasă din vibriionul holerice sau *Cl. perfringens*).

4. Citire și interpretare. Ultimul tub în care hematiile aglutinează sub forma unei pelicule grunjoase, cu margini neregulate pe fundul tubului, indică o unitate hemaglutinantă corespunzător diluției antigenului din tub.

De exemplu, dacă în ultimul tub cu hematii aglutinate este diluția 1/128, soluția nediluată va conține pe unitate de volum 128 unități hemaglutinante. În reacția de hemaglutinoinhibare (RHI) se lucrează cu 4 unități hemaglutinante, adică cu diluția 1/32.

27.3. REACȚIA DE HEMAGLUTININHIBARE

Reacția de hemaglutinoinhibare (RHI) este o tehnică foarte sensibilă și specifică, reușind să discrimineze anticorpi specifici în raport cu tipuri, subtipuri și variante de virus.

1. Principiul reacției. Anticorpii antivirali previn în mod specific aglutinarea hematiilor de către virus. Chiar virusuri care nu aglutinează hematiile pot fi atașați la hematii tratate cu acid tanic sau alți agenți „lianți” și evidențiați printr-o reacție de hemaglutinare. Acesta este însă principiul hemaglutinării pasive.

2. Materialele necesare au fost indicate la RHA.

3. Tehnica reacției. Serurile care urmează a fi testate sînt mai întîi tratate, pentru a îndepărta inhibitorii nespecfici ai hemaglutinării. Uneori aceste proceduri diluează serurile, lucru de care trebuie ținut seamă în efectuarea diluțiilor ulterioare și aprecierea titrului final al reacției ;

- serurile tratate sînt diluate binar în volum de 0,25 ml ;

- se adaugă în fiecare godeu 0,25 ml din diluția de antigen hemaglutinant care conține 4 unități HA, conform rezultatului RHA efectuată în aceeași zi ;

- se incubează 30 min la 37°C ;

- se adaugă 0,5 ml din aceeași suspensie de hematii folosită în RHA și se continuă incubarea la temperatura indicată. Martorii reacției sînt :

- martor sigur pozitiv cu ser standard, care conține un titru cunoscut de anticorpi ;

- martor sigur negativ cu ser normal, lipsit de anticorpi ;

- martor de hematii pentru verificarea absenței hemolizei sau hemaglutinării spontane ;

- martor pentru verificarea potenței antigenului (în fapt, o reacție de hemaglutinare în care se titrează din nou diluția de lucru).

4. Citirea reacției. Reacția pozitivă este indicată de absența hemaglutinării — depozit de hematii „în bănuț”, inel cu margini regulate.

5. Interpretare. Se determină ultima diluție de ser care mai previne aglutinarea. Această diluție indică titrul HI al serului. În hemaglutinarea pasivă, citirea și interpretarea se fac invers : titrul este dat de ultima diluție a serului care aglutinează hematiile cuplate cu antigenul viral.

27.4. REACȚIA DE SERONEUTRALIZARE

Anticorpii interacționează specific cu virusurile și le neutralizează infectivitatea. Acest efect poate fi reprodus pe orice substrat capabil să indice multiplicarea virală : animal de laborator, ou de găină embrionat sau culturi de celule.

1. **Principiul reacției.** Incubarea virusului cu un ser antispecific previne boala experimentală la animal, reduce cantitativ leziunile în oul de găină embrionat și efectul citopatic pe culturi. Reacția este foarte sensibilă și specifică. Ea necesită, însă, condiții mai pretențioase de dotare și de pregătire a personalului.

2. **Materialele necesare.** În afara instrumentarului și a agenților serologici menționați la celelalte reacții, seroneutralizarea presupune disponibilitatea sistemului indicator al replicării virale. Culturile de celule sînt astăzi cel mai frecvent utilizate. De reținut că sticlăria și soluțiile saline utilizate trebuie să fie sterile. Reacția este precedată de titrarea puterii infectante a antigenului, întrucît se lucrează cu o cantitate determinată de antigen : 100 doze infectante.

3. **Tehnica reacției.** Date fiind deosebiri care intervin în executarea reacției de la virus la virus, nu pot fi date decît cîteva indicații generale. Serurile se inactivează, înainte de a fi diluate, 30 min la 56°C, pentru a îndepărta inhibitorii nespecfici ai infectivității. Se poate lucra în două sisteme : cu o diluție constantă de antigen și cu diluții variabile de ser sau, invers, cu diluții variabile de antigen și o diluție constantă de ser. Amestecul ser-virus este incubat 30 min la 37°C și inoculat apoi în culturi de celule. După un interval variabil de timp (zile), în momentul cînd în tuburile martor inoculate cu virus fără anticorpi apare efectul citopatic, se determină titrul seroneutralizant al serului.

4. **Citirea reacției.** Cea mai mare diluție de ser care inhibă apariția bolii experimentale la animal sau a efectului citopatic în culturi exprimă titrul seroneutralizant. Întrucît, uneori, acțiunea anti-serului asupra infectivității este reversibilă, trebuie bine controlați o serie de parametri : timpul și temperatura de incubare a amestecului virus-ser, volumul reacției etc.

5. **Interpretare.** La fel ca în toate reacțiile serologice, și în seroneutralizare se apreciază creșterile de titru pe probe duble de ser. Creșteri de peste 4 ori după trecerea prin boală sînt semnificative pentru diagnosticul pozitiv.

27.5. REACȚIA DE AGLUTINARE LA RECE

Această reacție evidențiază prezența unor anticorpi — crioaglutinine — care, la $+4^{\circ}\text{C}$, aglutinează hematiile proprii ale bolnavului sau hematiile umane de grup 0 (I). Reacția nu este specifică, deși este uneori utilizată în diagnosticul pneumoniilor cu germeni din genul *Mycoplasma* (50—60% pozitivitate).

Astăzi diagnosticul serologic în toate bolile virale beneficiază de noi tehnici specifice, care pot asigura un diagnostic rapid. Cele mai răspândite dintre aceste tehnici sînt *reacția de imunofluorescență* (IF), *reacția imunoenzimatică* (IE) și *reacția radioimunologică* (RIA). Principiul comun al acestor tehnici este cuplarea unuia din reactanți — antigen sau anticorp — cu un *marker*: substanță fluorescentă, enzimă sau radioizotop. Cuplarea nu alterează specificitatea reac-

ției antigen-anticorp, care este evidențiată de markerul respectiv

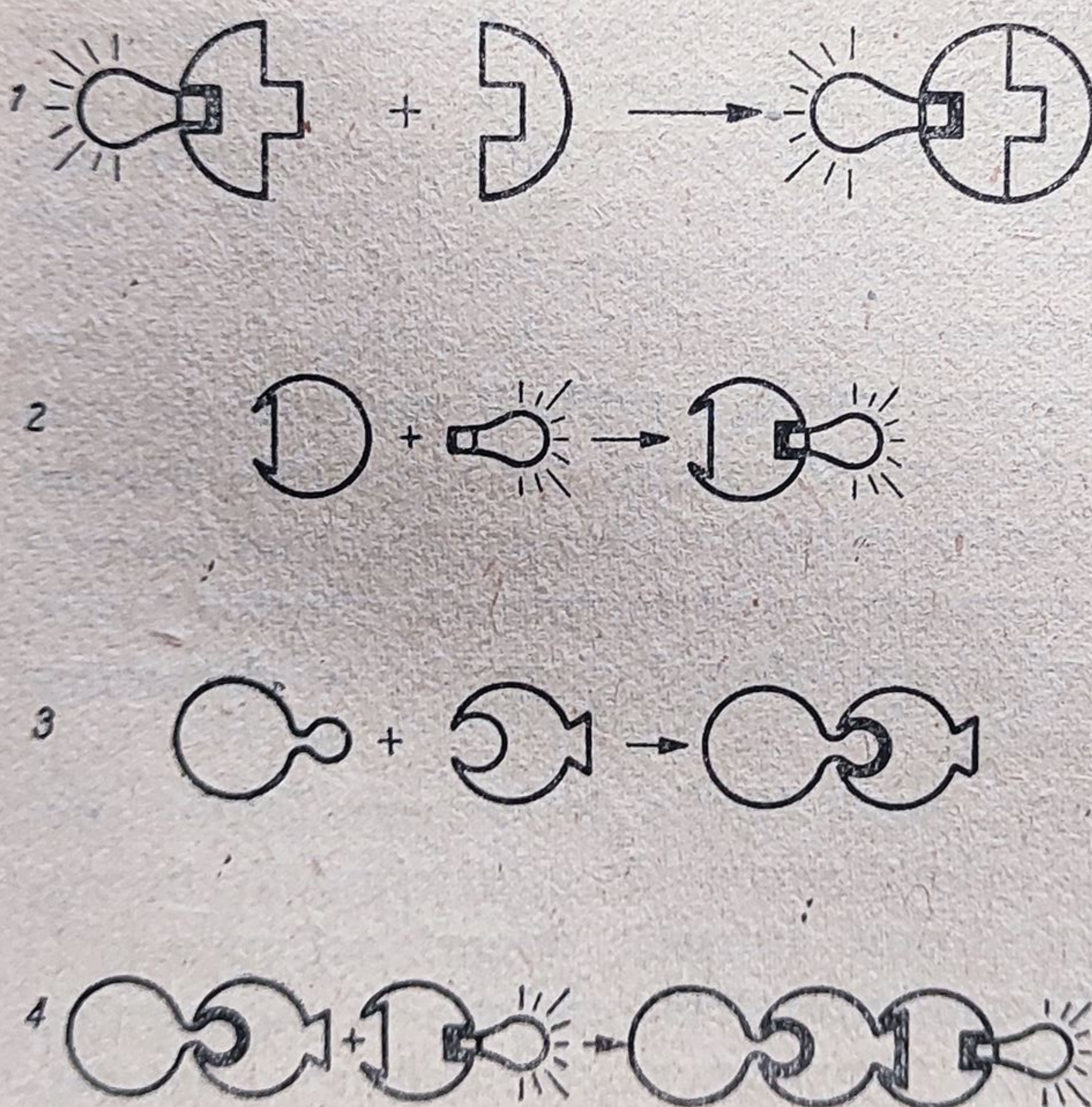


Fig. 18. Reacția de imunofluorescență (IF):

rîndul 1 — reacție de IF directă (anticorp marcat+antigen); rîndurile 2, 3 și 4 — reacție de IF indirectă;
rîndul 2 — marcarea serului antiglobulinic;
rîndul 3 — reacția antigen+anticorp;
rîndul 4 — cuplarea complexului antigen-anticorp cu serul antiglobulinic marcat.

În figura 18 este schematizată desfășurarea reacției de imunofluorescență în două variante: *directă* și *indirectă*. În primul caz folosim seruri antimarcate fluorescent, care diagnostichează antigene virale; în al doilea caz, reacția virus-anticorp este numai o primă etapă. Ulterior, la complexul antigen-anticorp se adaugă ser antiglobulinic cuplat fluorescent, care evidențiază reacția.

VIROZE ALE APARATULUI RESPIRATOR

Infecțiile respiratorii acute, atât cele virale, cât și cele bacteriene, constituie o cauză majoră de morbiditate și mortalitate, responsabilă de o proporție importantă din zilele de incapacitate temporară de muncă. Această situație se datorește faptului că virozele acute nu constituie o maladie distinctă, datorată unui agent unic. Ele reprezintă o diversitate de stări clinice cauzate de o multitudine de agenți (fig. 19). S-a calculat că fiecare persoană adultă este expusă anual la 6 episoade respiratorii acute, ceea ce determină, la scară națională, pierderea a milioane zile muncă. Gravitatea virozelor respiratorii este deosebită la vârstele extreme. La nou-născuți și bătrâni, mortalitatea prin viroze respiratorii reprezintă peste 70% din totalitatea cauzelor de deces.

28.1. GRIPA

Virusul gripal a fost izolat în 1933, după care an de an noi tulpini de gripă au fost identificate de la cazuri sporadice sau epidemice. Izolările succesive au scos în evidență o importantă particularitate a virusurilor gripale: schimbări continue ale antigenelor de suprafață (hemaglutinină și neuraminidază), care sînt un mecanism esențial al evoluției infecțiilor gripale.

Există *trei tipuri* de virus gripal: A, B și C, care diferă între ele prin



Fig. 19. Diagramă reprezentînd frecvența cu care anumite virusuri respiratorii produc simptomatologii diferite.

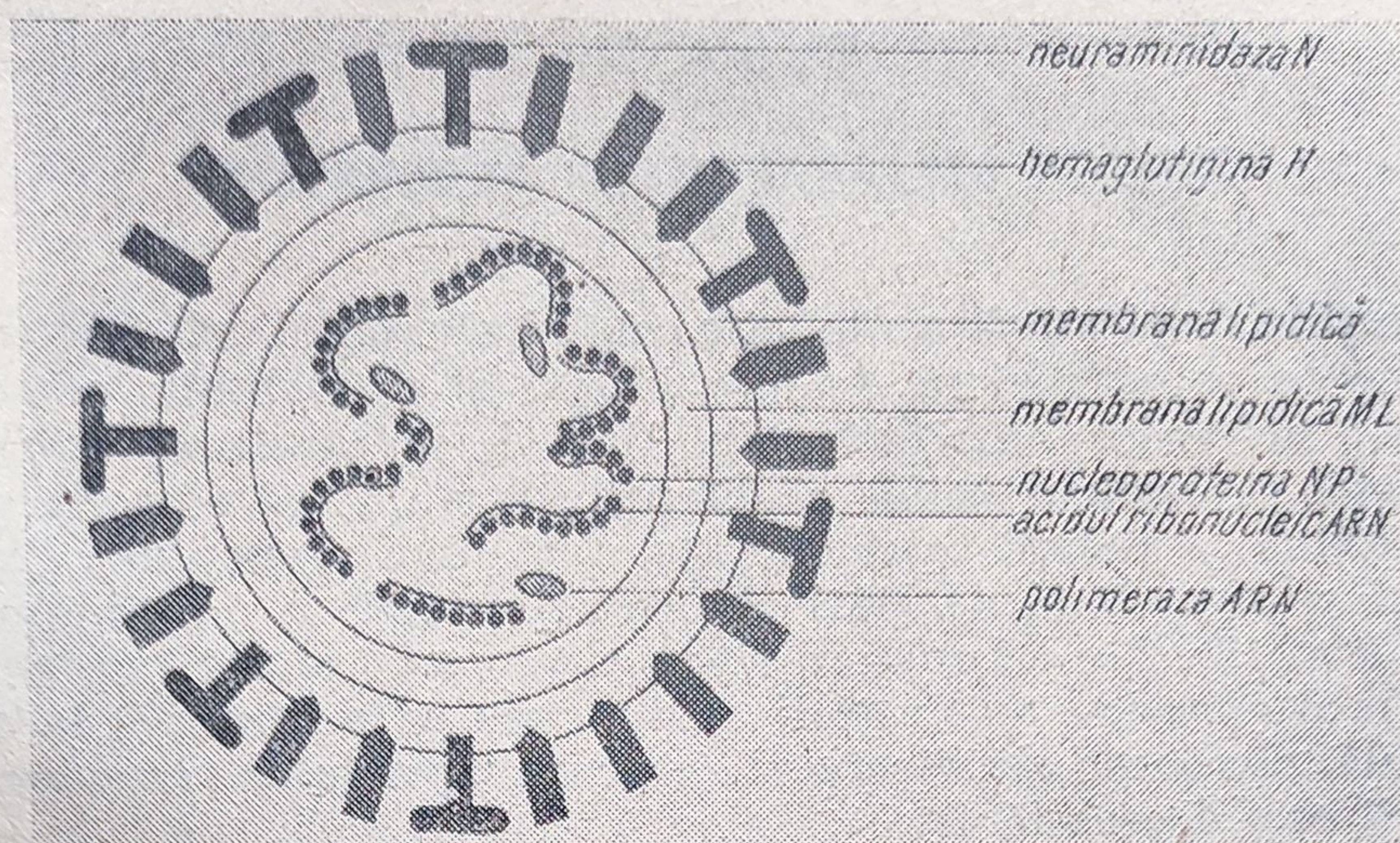


Fig. 20. Structura virusului gripal.

structura nucleoproteinei interne și a antigenelor proteice de suprafață (fig. 20). Tipul A este caracterizat de o modificare neîntre-ruptă a antigenelor superficiale, care explică posibilitatea infec-țiilor repetate la același individ, lipsa unei imunități de durată și apariția epidemiilor periodice (tab. 8).

Proprietățile virusului. Virusurile gripale au genomul constituit din ARN. Acidul nucleic nu reprezintă o moleculă unică, ci este alcă-tuit din câteva fragmente. Fragmentarea genomului explică plas-ticitatea virusului gripal, adică frecvența modificărilor de antigeni-citate.

Tabelul 8

Caracteristicile antigenice ale tulpinilor pandemice
de virus gripal

Anul pandemiei	Tulpina pandemică prototip	Simbolul tulpinii	Modificări antigenice în :	
			hemaglu- tinină (H)	neurami- nidază (N)
1918	A/Porto Rico/8/34	H ₀ N ₁	+	-
1946	A/FM/1/47	H ₁ N ₁	+	-
1957	A/Singapore	H ₂ N ₂	+	+
1968	A/Hong-Kong/1/68	H ₃ N ₂	+	-
1978	A/U.R.S.S./90/77	H ₁ N ₁	+	+

Notă : În prezent, circulă paralel tulpinile H₃N₂ și H₁N₁.

Virusul gripal este relativ termostabil, putînd fi păstrat la temperaturi sub $+4^{\circ}\text{C}$, cîteva săptămîni. De aici frecvența îmbolnăvirilor în sezonul rece. Infectivitatea virusului este rapid distrusă de căldură, ultraviolete, antiseptice. În afara infectivității, virusul gripal are și o acțiune toxică, manifestată prin leucopenie și leziuni ale miocardului.

Structura antigenică și cultivarea virusului. Tulpinile umane de virus gripal pot infecta și unele animale de laborator (dihor, șoa-rece), însă gazda cea mai folosită pentru cultivarea virusului este oul de găină embrionat (inocularea intraamniotică). Două antigene ale virusului au importanță epidemiologică deosebită : hemaglutinina și neuraminidaza.

Hemaglutinina asigură absorbția virusului pe hematii și pe celulele ciliate ale tractului respirator.

Neuraminidaza, distinctă antigenic, este o enzimă care determină eluția virusului din complexe virus-hematii.

Anticorpii specifici pentru fiecare din cele două antigene intervin în apărarea antigripală. Variații minime în structura hemaglutininei sau neuraminidazei condiționează apariția unor variante cu potențial epidemiogen deosebit. Întotdeauna astfel de modificări au dus la epidemii masive, datorită lipsei de anticorpi la populație față de noua variantă de virus.

Patogeneza și clinică. Virusul intră în tractul respirator superior prin aerosoli eliminați de bolnav prin tuse sau strănut. Multiplicarea primară a virusului are loc în epiteliul respirator. Scăderea viscozității mucusului protector, determinată de activitatea sa enzimatică, favorizează difuziunea virusului către tractul respirator inferior (bronhiole, alveole). În acest caz se poate produce pneumonia gripală interstițială. Perioada de incubatie a gripei este de 1—2 zile. În afara simptomelor respiratorii, boala se caracterizează prin fenomene generale : febră, oboseală, dureri musculare care durează 3—4 zile. Complicațiile sînt frecvente la copiii sub 2 ani și bătrînii peste 65 de ani (acestea sînt grupele de vîrstă cu risc crescut). De asemenea, bolnavii cronici pulmonari sau cardiaci fac frecvent complicații datorită suprainfecțiilor bacteriene.

Diagnosticul de laborator. Izolarea virusului poate fi făcută din spălături nazo-faringiene, în 24 de ore de la inocularea în oul de găină embrionat. Diagnosticul retrospectiv se face prin titrarea anticorpilor hemaglutinoinhibanți. O metodă rapidă de diagnostic, care poate diferenția gripa de alte infecții respiratorii acute, este *imuno-fluorescența* aplicată frotiurilor obținute din spălăturile sau secrețiile nazo-faringiene.

Imunitate, epidemiologie, profilaxie. Imunitatea consecutivă bolii sau vaccinării este tranzitorie. La același individ pot surveni episoade gripale repetate. Acest fapt se explică prin două elemente :

— virusul gripal are frecvente variații antigenice apărute ca un mecanism adaptativ al evoluției virusului în cadrul unei populații imune ;

— în gripă, anticorpii importanți din punctul de vedere al rezistenței la boală sînt cei localizați la nivelul tractului respirator (Ig A), care au o specificitate îngustă și sînt trecători.

Pe un fond de morbiditate medie (fond endemic), gripa survine în *valuri epidemice*, succesive, mai ales în sezonul rece. Gripa de tip A are o contagiozitate mai mare, iar anii epidemici apar mai des (la doi-trei ani). Epidemiile de mare amploare, la scara întregului glob, se numesc *pandemii*.

Intrucît eficacitatea vaccinurilor gripale este moderată, se mențin cîteva reguli clasice de conduită în eventualitatea unor epidemii: *izolarea bolnavilor, îndepărtarea de sursele de infecție a persoanelor cu risc (copii, bătrîni, gravide), menținerea igienei*, care să prevină complicațiile bacteriene.

28.2. GUTURAIUL

Guturaiul este o viroză benignă, însă foarte răspîndită. El provoacă epidemii sezoniere în perioadele de tranziție toamnă-primăvară. Etiologia guturaiului nu este unică, putînd fi provocat de peste 200 virusuri.

Iată cîteva dintre ele : rhinovirusurile (peste 100 serotipuri), adenovirusurile (peste 30 serotipuri), reovirusurile, virusurile corona, virusurile paragripale etc.

Datorită pluralității etiologice, diagnosticul de laborator este dificil. Din același motiv, profilaxia specifică este inoperantă. Se instituie, ca în cazul gripei, *tratament simptomatic și măsuri generale de igienă*.

28.3. ADENOVIROZELE

Adenovirusurile sînt virusuri ADN, cu replicare în nucleii celulelor infectate. Există 41 serotipuri, toate cu un antigen fixator de complement comun.

Adenovirozele sînt infecții ale tractului respirator asociate, uneori, cu infecții conjunctivale (așa-numita conjunctivită a bazinelor

de înot). Incubația este de 5—7 zile, evoluția benignă, iar imunitatea destul de persistentă. La copii, adenovirusurile pot infecta și tractul digestiv.

Diagnosticul se face prin izolare în culturi de celule, unde adenovirusurile produc un efect citopatic specific, constând în incluziuni intranucleare. Tipizarea se face prin hemaglutinoinhibare sau seroneutralizare.

28.4. PNEUMOPATIILE VIROTICE

Pneumopatiile virotice diferă de cele bacteriene prin localizarea leziunilor difuz interstițial, ceea ce produce, radiologic, o simptomatologie caracteristică, constând în accentuarea desenului hilar. Între agenții etiologici ai acestor pneumonii se citează : *virusul respirator sincițial*, *virusurile gripale* și *paragripale*, *adenovirusurile*.

Un alt grup de germeni care determină pneumonii sub formă endemo-epidemică sînt **micoplasmele**. Acestea se deosebesc atît de virusuri, cît și de bacterii (v. tab. 1).

Mycoplasma pneumoniae determină o afecțiune caracteristică : **pneumonia atipică primară**. Incubația este de 1—3 săptămîni, iar simptomatologia respiratorie, însoțită de alterarea stării generale, durează 3—4 săptămîni. Vindecarea este grăbită de tratamentul cu tetraciclina. Micoplasmele pot fi izolate pe medii lipsite de celule vii (spre deosebire de virusuri), care trebuie însă suplimentate cu factori de creștere din drojdia-de-bere sau serul de vițel. Ele produc colonii mici — vizibile doar cu lupa —, foarte aderente la mediu. Diagnosticul serologic poate fi pus prin RFC sau hemaglutinare pasivă.

Tema 29

PAROTIDITA EPIDEMICĂ (OREIONUL)

Oreionul este o viroză comună copiilor mai mari și adolescenților, caracterizată de inflamația nesupurativă a glandelor salivare (în special parotida). Formele clinice inaparente sînt foarte frecvente. Uneori, însă, boala se complică cu meningită, otită, pancreatită.

1. **Etiologie.** Virusul oreionului, numit *urlian*, este un paramixovirus termosensibil, hemaglutinant. Se cultivă foarte bine în oul de găină embrionat sau pe culturi de celule — substraturi pe care se face și diagnosticul de laborator al acestei viroze.

2. Patogenie și clinică. Oreionul se transmite pe cale aerogenă. Incubația este foarte lungă : 18—21 zile. Urmează o perioadă prodromală cu febră, anorexie, stare de rău. Perioada de stare, caracterizată de tumefierea dureroasă a uneia sau ambelor parotide și a altor glande salivare, durează o săptămână. Bolnavul este contagios în timpul perioadei prodromale și la începutul perioadei de stare. Complicațiile apar către sfârșitul perioadei de stare ; ele au o evoluție benignă și un prognostic bun.

3. Diagnostic de laborator. Deși simptomatologia este elocventă pentru diagnostic, unele probleme se pun în cazul formelor atipice (fără inflamare parotidiană) și a meningitelor. Izolarea virusului se face frecvent din salivă sau spălături nazo-faringiene. De asemenea, este unul din puținele virusuri care poate fi lesne izolat din urină, și, în cazul meningitelor, din lichidul cefalorahidian: Prezența anticorpilor este evidențiată prin reacția de fixare a complementului, care se pozitivează timpuriu, la sfârșitul perioadei de stare și, prin hemaglutinoinhibare, în convalescență.

4. Imunitate, epidemiologie, profilaxie. Imunitatea este permanentă, neexistând decât un singur tip antigenic de virus. Imunitatea survine și consecutiv formelor inaparente (20—30% din cazuri). Contagiozitatea virusului este moderată, încât un sfert din cazuri apar la adolescenți și adulți tineri. Astăzi există vaccinuri vii atenuate care, după o singură inoculare, conferă o imunitate asemănătoare celei consecutive bolii (practic, toată viața).

Intrucât calendarul vaccinărilor în primii ani de viață ai copilului este foarte aglomerat, introducerea vaccinării antiurliene de rutină nu este posibilă. Totuși, vaccinul viu antiurlian poate fi administrat simultan cu vaccinurile vii antirujeolos și antirubeolos, asigurându-se astfel imunizarea timpurie a tuturor copiilor. Această vaccinare polivalentă, constând în administrarea într-o singură inoculare a trei vaccinuri virale vii atenuate, este o soluție de viitor în practica imunizării antivirale.

T e m a 30

VIROZE ERUPTIVE

Multe infecții virale, localizate sau sistemice, afectează pielea sub forma unor erupții maculopapulare, veziculare sau hemoragice. Diagnosticul etiologic al acestor erupții este simplu, într-un con-

text epidemiologic bine definit. Totuși, în clinică, se întâlnesc pronunțări de erupție (rash) rujeoliformă, care exprimă incertitudinea diagnosticului și atrag atenția asupra altor posibile etiologii (tab. 9).

Tabelul 9

Erupții virale

Sindromul dermatologic	Agentul etiologic	
	obișnuit	puțin obișnuit
Rash maculopapular	rujeolă, rubeolă virusuri ECHO (tip 4, 6). Coxsackie A ₉ , A ₁₆ etc.	virusuri ECHO (tip 2, 5) Coxsackie A ₂ , B ₁ , arbo- virusuri, mononucleoză infecțioasă
Rash veziculopustulos	varicelă, zona zoster, herpes	variola-vaccină, enterovirusuri
Rash hemoragic	arbovirusuri, arenavirusuri	variola

30.1. VARIOLA-VACCINA

Variola, viroză de mare gravitate care generații de-a rîndul a decimat populația globului, a dispărut astăzi din practica medicală. Acesta este, probabil, cel mai spectaculos succes al medicinei contemporane. În anii 1978—1979 Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a certificat eradicarea bolii. În prezent, *virusul variolic* nu mai poate fi întâlnit decît în anumite laboratoare sau colecții. Vaccinarea antivariolică va continua să se aplice, ca o măsură suplimentară de protecție, încă un număr de ani. Este de așteptat ca, în urma demonstrării stabilității situației epidemiologice actuale (de eradicare a bolii), să se renunțe la vaccinarea cu caracter de masă. Vaccinul va fi aplicat numai grupelor de populație cu risc profesional și, în primul rînd, personalului sanitar din spitalele de boli contagioase și de la punctele de frontieră.

Variola este determinată de *virusul variolei umane*, virus ADN.

Vaccina recunoaște drept agent etiologic virusul variolei vacilor, din același grup. Între cele două virusuri există imunitate încrucișată. Pe acest ultim fapt se bazează vaccinarea antivariolică ce folosește, drept virus vaccin, virusul variolei vacilor, numit și *virus vaccinal*.

Din punct de vedere istoric, vaccinarea antivariolică este prima care a intrat în practica medicală și care, după cum s-a văzut, eradicînd boala, a fost prima care a părăsit calendarul vaccinărilor obligatorii.

30.2. VARICELA. ZONA ZOSTER

Varicela (vărsatul de vînt) este o boală benignă, dar foarte contagioasă, a primei copilării.

Zona zoster (*zoster* = brîu) este frecvent întîlnită la bătrîni.

Ambele boli sînt determinate de același *virus din grupul beta-herpes*. Copiii se contaminatează între ei sau de la bătrîni suferinzi de zona zoster, făcînd varicelă. Bătrîni, în schimb, fac zona zoster numai dacă au suferit în copilărie de varicelă, virusul rămînînd în stare latentă în celulele nervoase ale ganglionilor spinali și reactivîndu-se ocazional.

Dintre virusurile herpetice, virusul varicelei se individualizează prin spectrul de gazdă îngust al celulelor pe care se pot cultiva. Într-adevăr, acest virus se cultivă numai pe celule de origine umană, unde produce efect citopatic caracteristic, constînd în incluzii intranucleare. O altă caracteristică a acestui virus, comună tuturor virusurilor herpetice, este capacitatea de a produce infecții latente. Virusul persistă întreaga viață în anumite țesuturi, fără a determina vreo simptomatologie. Anumite condiții care determină scăderea rezistenței individului rup echilibrul latent al infecției și virusul produce simptomatologia caracteristică zonei zoster: erupție maculopapulară la nivelul unui spațiu intercostal, cu evoluție către vezicule, pustule, cruste. Aspectul dermatologic este elocvent, încît diagnosticul de laborator nu este necesar. Rareori, unele forme grave de varicelă pun problema diagnosticului diferențial cu variolă. Diagnosticul rapid se face prin imunofluorescență sau prin microscopie electronică. Fiind vorba de virusuri din grupuri diferite, morfologia și antigenicitatea lor sînt deosebite.

30.3. HERPESUL

Grupul virusurilor herpetice infectează o mare varietate de animale, de la batracieni și păsări, pînă la mamifere. De un interes major pentru patologia umană sînt cele trei genuri de virusuri herpetice umane :

- *alfaherpes*, cu virusurile *Herpes simplex* de tip 1 și 2 ;
- *betaherpes*, incluzînd *virusul varicelă-zoster* și *virusul citomegalic* ;

— *gamma*herpes, cu prototip *virusul Epstein Barr* — agent al mononucleozei infecțioase și, posibil, al unor cancere umane.

Virusurile *Herpes simplex* de tip 1 determină, de regulă, erupții periorale, iar cele de tip 2, erupții genitale. Virusul citomegalic este implicat în unele malformații congenitale, în afecțiuni febrile apărute la bolnavi imunosupresați etc.

Simptomatologia variată produsă de herpes este urmare a viremiei generalizate. În afara infecțiilor primare (de multe ori inaparente), sînt caracteristice pentru herpes infecțiile recurente. Recurențele apar în ciuda prezenței în serul bolnavilor a anticorpilor antiherpetici.

Mecanismul probabil al latenței și reactivării herpesului. Consecutiv infecțiilor primare, virusul se propagă ascendent, de-a lungul fibrelor nervoase senzitive, pînă la nivelul ganglionilor spinali. Aici se realizează o infecție latentă, persistentă, datorită incapacității anticorpilor de a pătrunde în neuroni și de a neutraliza virusul. Situații diverse (stres fizic sau emoțional, stări febrile, menstruația etc.) determină propagarea inversă, centrifugă, de la ganglionii spinali la terminațiile senzitive din piele și, de aici, la celulele epidermice.

Histologic, leziunile herpetice sînt localizate la nivelul pielii și mucoaselor și constau în proliferarea celulelor bazale ale epidermului, degenerare balonizantă, incluzii intranucleare.

Intrucît virusurile herpetice sînt dintre cei mai ubicvitari paraziți ai omului, simpla lor izolare nu indică neapărat că afecțiunea investigată este de origine herpetică. Diagnosticul trebuie întregit serologic prin RFC și seroneutralizare.

Mecanismul particular al recurențelor herpetice face din aceste afecțiuni probleme terapeutice dificile. Există cîteva medicamente, inhibitori ai replicării virale, care au însă efecte secundare pronunțate. De asemenea, imunoglobulinele specifice aduc un beneficiu temporar și limitat.

Tema 31

RUJEOLA ȘI RUBEOLA

Aceste viroze eruptive sînt infecții comune ale primei copilării. Evoluția lor benignă a făcut ca semnificația rujeolei (pojarului) și a rubeolei să fie subapreciată din punctul de vedere al sănătății

publice. Incidența deosebit de mare, frecvența complicațiilor, efectele teratogene (inducția de malformații la făt, efect specific rubeolei) au determinat preocuparea pentru obținerea și administrarea unor vaccinuri eficiente. Un astfel de vaccin se aplică pentru rujeolă și la noi în țară.

31.1. RUJEOLA

Virusul rujeolos face parte din paramixovirusuri (împreună cu virusul urlian, virusurile paragripale și virusul respirator sincițial). Este un virus ARN, deosebit de fragil. Căldura, radiațiile, antisepticele îl inactivează rapid. Virusul poate fi lesne izolat în culturi de celule de origine simiană sau umană.

Rujeola este o viroză cu propagare aerogenă. După o incubatie de 9—11 zile apar simptome prodromale : *tuse, coriză, febră, conjunctivită*. Eruptia apare în ziua a 14-a de la contactul infectant și constă în rash maculopapular catifelat. În cursul bolii se notează o hiperplazie a țesutului limfatic, în care virusul se replică activ. În acest fel sistemul imunitar limfatic este afectat de infecția rujeoloasă, ceea ce explică scăderea rezistenței la infecții (anergia) consecutivă bolii.

În 10—20% din cazuri, evoluția rujeolei se complică cu otite, pneumonii, encefalite. Semnele clinice ale bolii sînt caracteristice, încît laboratorul este rareori chemat în sprijinul diagnosticului. Unele eruptii atipice necesită confirmarea de laborator a etiologiei rujeolice. Diagnosticul serologic se face prin hemaglutinoinhibare.

Există un singur tip antigenic de virus rujeolos. Imunitatea consecutivă bolii este de durată ; este exclusă posibilitatea unei a doua rujeole. În prezent există vaccinuri vii atenuate care conferă copiilor, după o singură inoculare, rezistență pe toată durata vieții. În condițiile aplicării vaccinării în masă există perspectiva eradicării sau reducerii marcate a incidenței rujeolei.

31.2. RUBEOLA

Virusul rubeolos este clasificat în același grup cu virusurile encefalitelor virale. Deși are proprietăți comune cu arbovirusurile (stabilitate termică minimă, activitate hemaglutinantă, efect citopatic în unele culturi de celule), boala determinată de virusul rubeolos este net diferită.

Rubeola este o viroză aerogenă a copiilor, exteriorizată clinic prin *febră, rash și limfadenopatie* (de obicei, în regiunea occipitală).

Rareori evoluția se complică cu arterite sau purpuri trombocitopenice. Dacă boala este benignă și poate trece neobservată la copii, semnificația ei este deosebită în cazul în care gravidele fac rubeolă. Rubeola este teratogenă când survine în primul trimestru al sarcinii.

În cadrul **sindromului rubeolos congenital** se descriu următoarele efecte teratogene ale rubeolei: *surditate, orbire* (cataractă, retinopatii, glaucom), *defecte congenitale ale inimii, retardare psihointelectuală* (microcefalie). În 10—20% din cazuri feții născuți în cadrul sindromului rubeolos congenital mor în primul an de viață. Patogenia sindromului congenital se explică prin replicarea virusului în placentă și făt. Replicarea virusului în țesuturile embrionare nu determină moartea celulelor ci o stare de infecție persistentă în care celulele supraviețuiesc, dar cu potențial de creștere și diferențiere diminuat.

În prima lună de sarcină infecția rubeoloasă a gravidelor determină malformații congenitale în 80% din cazuri; în luna a 3-a, în numai 15% din cazuri. Infecția intrauterină este însoțită de persistența virusului la făt de unde poate fi izolat 2—3 ani după naștere.

Diagnosticul de laborator al rubeolei este solicitat frecvent la gravide, care pot face erupții cu etiologii diverse. Prezența anticorpilor exclude o rubeolă recentă și, deci, posibilitatea apariției malformațiilor congenitale. În caz contrar se suspicionează rubeola, ceea ce indică o anumită conduită terapeutică. Reacția serologică frecvent efectuată este hemaglutinoinhibarea.

Imunitatea consecutivă rubeolei tipice asigură protecție pe toată durata vieții. Contagiozitatea bolii este pronunțată, totuși epidemiile survin la interval de câțiva ani. Peste 20% din copii nu fac boala pînă la vîrstă adultă. Există vaccinuri vii atenuate care pot induce o rezistență de durată numai după o singură inoculare. Administrarea lor este indicată în special fetelor, pentru a preveni sindromul rubeolos congenital. De cele mai multe ori imunizarea se face cu vaccin trivalent antirujeolos, antirubeolos și antiurlian.

Tema 32

ENTEROVIROZE

Enterovirusurile, împreună cu rhinovirusurile, constituie grupul picornavirusurilor (*pico* = mic; *rna* = acid ribonucleic). Clasificarea picornavirusurilor și principalele caractere distinctive între genuri sînt indicate în tabelul 10.

Clasificarea picornavirusurilor umane

Genul	Subgenul	Serotipul	Caractere distinctive
Enterovirusuri	Poliovirusuri Coxsackie	1—3 A (24 tipuri) B (6 tipuri)	Omul este singura gazdă În afară de om și culturi de celule umane și simiene, sînt patogene la șoarece nou-născut. Nu sînt patogene pentru șoarece nou-născut. Spre deosebire de enterovirusuri, sînt instabile la pH acid (sub 6)
	ECHO virusuri*	33 tipuri	
Rhinovirusuri		89 tipuri	

În grupa picornavirusurilor se încadrează un important patogen pentru animale condiționat patogen la om — virusul febrei aftoase (v. tema 33).

* Inițialele ECHO semnifică: enteric citopatogen human orfan.

Enterovirusurile sînt paraziți obișnuiți ai tractului alimentar. Spectrul bolilor umane pe care le provoacă enterovirusurile este larg. Diferite virusuri pot produce același tablou clinic și, invers, același virus poate determina o simptomatologie variată.

32.1. POLIOMIELITA

Există *trei tipuri serologice de virus poliomieltic*, care se diferențiază prin reacția de seroneutralizare. Poliovirusurile se cultivă numai în culturi de celule de la primat (om sau maimuță). Boala experimentală poate fi reprodusă numai la maimuță, de obicei după inoculare spinală. Totuși, tipul 2 este patogen și pentru șoarece nou-născut.

Poliomielita este o afecțiune acută a sistemului nervos central. Distrucția neuronilor motori centrali determină *paralizii flasce*. Patogenia bolii este interesantă. Poarta de intrare a virusului este digestivă. Orofaringele și intestinul constituie sediul replicării primare. Sistemul nervos este afectat ulterior, fiind invadat pe cale circulatorie. Neuronii motori din sistemul nervos central constituie sediul de elecție al replicării secundare a virusului, leziunile fiind de tip distructiv.

Diagnosticul de laborator în poliomielită vizează, în primul rînd, izolarea virusului (din materii fecale, eventual apă și alimente contaminate), cu precizarea tipului antigenic și a neurovirulenței.

Investigațiile serologice sînt utile în aprecierea gradului de imunizare a colectivităților.

Imunitatea în poliomielită este permanentă, dar limitată la serotipul care a cauzat infecția. Între tipurile 1 și 2 de poliovirus există oarecare rezistență încrucișată. Vaccinarea trebuie să asigure rezistență în raport cu toate cele 3 tipuri de poliovirus. Există vaccinuri virale vii, cu tulpini atenuate, și vaccinuri inactivate. Ambele se administrează în prescripții trivalente, adică includ cele trei tipuri antigenice de virus. Vaccinarea a redus foarte mult incidența bolii și circulația tulpinilor sălbatice (neurovirulente) în natură. Pentru a menține această situație epidemiologică, este necesară continuarea campaniilor de vaccinare în masă a copiilor încă din primele luni de viață. În țara noastră se aplică vaccinul poliomielitice viu atenuat, administrat pe cale orală.

32.2. INFECȚII CU VIRUSURI COXSACKIE

Virusurile coxsackie sînt împărțite în două subgrupuri : A și B, în funcție de potențialul patogen pentru șoarecele nou-născut. Subgrupul A produce miozită difuză și paralizie flască, iar subgrupul B miozită focală și necroză, eventual encefalită cu paralizie spastică.

Manifestările clinice ale infecțiilor coxsackie la om sînt :

— pentru subgrupul A : *guturai, herpangină, diarei benigne de vară* ;

— pentru subgrupul B : *mialgia epidemică, meningita aseptică, boală neonatală însoțită de moarte subită*. Există, deci, o varietate de manifestări condiționată, ca și în cazul virusurilor ECHO, de diversitatea antigenică și de proprietățile biologice ale tulpinilor.

Diagnosticul de laborator, foarte laborios, constă în izolări și identificări prin seroneutralizări sau hemaglutinoinhibări. Nu există vaccinuri. O dată intrat în colectivitate, orice enterovirus infectează o mare parte din populație, dar cele mai multe infecții sînt inaparente.

32.3. VIRUSURILE ECHO

Virusurile ECHO au fost inițial izolate din materiile fecale ale unor indivizi sănătoși ; de aici eticheta de „orfan“, în sensul lipsei unei boli clinice de la care să fie izolate. Există peste 30 de serotipuri care pot cauza *meningite, erupții, infecții respiratorii* și di-

gestive, dar cel mai frecvent infecțiile sînt asimptomatice. Se subliniază tropismul strict pentru om și capacitatea de a infecta culturile de celule cu producerea de efect citopatic. Nu există mijloace de profilaxie specifică (vaccinuri).

O atenție deosebită trebuie acordată infecțiilor ECHO la nou-născuți, caz în care survin afecțiuni grave cu caracter de epidemie intraspitalicească.

Tema 33

FEBRA AFTOASĂ LA OM

Virusul febrei aftoase este un picornavirus (v. tab. 10), instabil la pH mai mic de 6, asemănător rhinovirusurilor. Există mai multe serotipuri, fiecare prevalînd într-un anumit areal geografic unde determină epidemii grave la animale. Nu există rezistență încrucișată între serotipuri.

Febra aftoasă este, în principal, o infecție a bovinelor, dar poate afecta porcinele, ovinele, caprinele sau erbivorele sălbatice. Omul nu este afectat decît rareori. Infecția umană se traduce prin apariția elementelor eruptive — *vezicule aftoase* — pe mucoasa bucală (stomatita aftoasă) sau pe tegumente. Susceptibilitatea omului este redusă, astfel încît boala este rară, chiar în focarele epizootice (epidemii la animale) sau în laboratoarele în care se manipulează virusul febrei aftoase.

Veziculele aftoase au dimensiuni mici la început, apoi confluează și, în cele din urmă, se resorb lăsînd o crustă sub care se produce epitelizarea. Leziunile se vindecă în 10—12 zile de la debut. Aplicarea locală de antiseptice este recomandată, întrucît previne suprainfecția bacteriană.

Pentru diagnostic, în faza acută, se recoltează limfa aftoasă din vezicule. De aici virusul poate fi lesne izolat în culturi de celule sau de la animale de laborator. Spectrul de gazdă al virusului este foarte larg, numeroase specii fiind susceptibile la infecția aftoasă. După trecerea erupției se pot face reacții de seroneutralizare sau RFC.

La om, boala fiind rară și benignă, sînt suficiente măsurile de igienă generală ca măsuri profilactice. Dezinfecția mîinilor și purtarea materialului de protecție este obligatorie pentru personalul

muncitor care vine în contact cu animale bolnave. Laptele sau celelalte produse provenite de la animale bolnave trebuie sterilizate dar, mai bine, interzise de a fi date în consum.

Măsurile sanitare veterinare și, în primul rând, vaccinarea au contribuit la stăvilirea epizootiilor de febră aftoasă care provocau mari pagube, decimînd șeptelul. În multe țări boala a fost eradicată.

Tema 34

RABIA (TURBAREA)

Rabia sau turbarea este o encefalomielită infecțioasă fatală, comună omului și animalelor cu sînge cald. La om, *virusul rabic* este transmis aproape exclusiv prin mușcătura animalelor atinse de turbare sau purtătoare de virus în stare latentă.

Multe alte virusuri determină afecțiuni ale sistemului nervos central. Cele mai importante pentru patologia umană sînt *togavirusurile* (vechiul grup al arbovirusurilor, adică virusuri transmise de artropode) și *arenavirusurile*. Togavirusurile sînt agenți ai encefalitelor virale, iar arenavirusurile provoacă meningoencefalite. De curînd, o serie de afecțiuni „degenerative” ale sistemului nervos și-au probat etiologia virală. Este vorba de boli cu o incubatie foarte lungă (zeci de ani) provocate de virusuri lente.

34.1. VIRUSUL RABIC

Virusul rabic este un virus ARN foarte rezistent la stocarea la +4°C și chiar la temperatura camerei. Infectivitatea virusului este însă compromisă de ultraviolete, eter sau alte antiseptice. Tulpinile de virus recent izolate sînt numite „de stradă”. Ele au o incubatie lungă și neregulată (20—60 zile la cîine) și produc incluziuni caracteristice în creierul animalelor bolnave. Pasaje repetate făcute la iepure pe cale intracerebrală duc la obținerea tulpinilor „fixe”, cu incubatie scurtă și fixă (4—6 zile), incluziogeneză slabă și patogenitate exprimată numai consecutiv inoculării intracerebrale. Tulpinile fixe au fost obținute de Pasteur și evidențiază un principiu general de realizare a vaccinurilor virale vii atenuate. Cultivarea repetată a virusurilor pe substraturi depărtate de gazda naturală determină atenuarea patogenității tulpinilor virale.

34.2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR

La om, virusul rabic este transmis aproape exclusiv prin mușcătura animalelor atinse de turbare. Există un rezervor de virus domestic — câini, pisici, bovine — și un rezervor natural (sau silvatic) — lupi, vulpi, veverițe (în alte țări șacali, lilieci etc.).

Diagnosticul se bazează pe examenul histopatologic al creierului animalelor suspecte. Leziunea patognomonică este evidențierea incluziunilor intracitoplasmatiche în celulele cornului Ammon. Aceste incluziuni se numesc *corpui Babeș-Negri*. Dacă incluziunile sînt absente, se procedează la inocularea unei suspensii din creier sau a salivei la un animal sensibil : șoarece, hamster, iepure. Animalele inoculate dezvoltă boala experimental : *encefalită cu paralizii flasce* și apoi *moarte*. În creierul animalelor bolnave sau decedate se pot evidenția corpui Babeș-Negri. Detectarea antigenului rabic în țesuturile infectate poate fi evidențiată și prin metoda imunofluorescenței.

34.3. PROFILAXIA TURBĂRII LA OM ȘI ANIMALE

Profilaxia turbării la om vizează persoanele mușcate de animale suspecte. Se începe cu neutralizarea virusului chiar la poarta de intrare, la locul mușcăturii. Pentru aceasta :

- se spală plaga cu antiseptice, cît mai curînd posibil ;
- se face toaleta chirurgicală, fără a se aplica puncte de sutură ;
- se injectează ser antirabic în jurul plăgii.

Orice animal domestic care a mușcat un om trebuie ținut sub observație 5—7 zile, iar orice animal sălbatic care a provocat plăgi mușcate, neincitat, este privit ca rabigen.

Tratamentul antirabic constă în vaccinare și administrarea serului antirabic. Asocierea vaccinării cu seroterapia a fost inițiată de Victor Babeș.

Profilaxia turbării la animale și, în special, la câine necesită înregistrarea și vaccinare anuală obligatorie antirabică. De asemenea, se iau măsuri pentru a evita riscul mușcăturilor (câini legați, cu botniță etc.). Educația sanitară trebuie orientată spre a indica riscul sustragerii de la prevederile veterinare pentru animalele din jurul locuinței.

Te m a 35

HEPATITELE EPIDEMICE VIRALE

Există cel puțin patru virusuri distincte — agenți etiologici ai hepatitelor : *virusul A* pentru **heptita „infecțioasă”**, *virusul B* pentru **hepatita serică** („de seringă, de inoculare”), *virusul delta* și *virusurile hepatitelor non A — non B*.

Faptul că multe hepatite clinic diagnosticate sînt negative în ceea ce privește diagnosticul de laborator, și pentru virusul A și pentru virusul B, a făcut să se vorbească de o nouă categorie : hepatitele non A non B.

35.1. HEPATITA A

Virusul hepatitei A a fost evidențiat în fecalele bolnavilor sub forma unor particule mici, asemănătoare enterovirusurilor. Pentru diagnostic s-a folosit *imunoelectronmicroscopia*. Extractele din materii fecale sînt tratate cu anticorpi specifici. Se observă agregate mari de particule virale învelite într-un halou de anticorpi. Alte tehnici de diagnostic sînt : *metodele radioimunologice* și *enzimoimunologice*. Pe lângă aceste teste virusologice, își păstrează actualitatea — în hepatita A și B — *investigațiile biochimice*, care cuprind o gamă variată de teste de disproteinemie, enzimatică și electroforetice.

Infectivitatea virusurilor hepatitice A și B este deosebit de rezistentă la căldură și antiseptice, ceea ce reclamă mare prudență în manipularea probelor de la bolnavi și în sterilizarea instrumentarului. Pentru inactivarea virusurilor este necesară autoclavarea la 121°C, timp de 20 min, sau cu căldură uscată la 180°C, timp de 60 min.

Datele comparative privind virusurile hepatitice și bolile pe care le determină sînt sintetizate în tabelul 11. Pentru hepatita A sau „infecțioasă” este relevantă incubția relativ scurtă (2—6 săptămîni). De asemenea, reținem calea de transmitere fecal-orală și raportul scăzut între formele anicterice și icterice (1/1 la adulți, pînă la 12/1 la copii). Evoluția hepatitei A este mai benignă decît a hepatitei B. Profilaxia cu imunoglobuline este eficientă. De curînd au fost testate vaccinuri care par să confere o protecție de durată.

**Date comparative clinice și epidemiologice
în hepatita A și B**

Caracteristici	Hepatita A	Hepatita B
Incubație	2—6 săptămîni	6—26 săptămîni
Transmitere	fecal-orală	parenterală (predominant)
Contagiozitate (durată)	1—3 săptămîni	1—3 luni (uneori ani)
Transaminaze crescute	1—3 săptămîni	4—30 săptămîni
Cronicizare	rară	frecventă
Mortalitate	0,1 %	1—10 %
Profilaxie de imunoglobuline	previne icterul	răspuns variabil

35.2. HEPATITA B

Complexitatea morfologică a virusului hepatitei B a fost evidențiată la microscopul electronic.

Diagnosticul hepatitei B se face printr-o suită de metode cu sensibilitate din ce în ce mai mare. Metodele mai puțin sensibile, de primă generație, sînt *imunodifuzia* și *RFC* (fig. 21). Metodele de generația a 2-a sînt *electroimunodifuzia*, *hemaglutinarea pasivă* și *latexaglutinarea*, iar cele mai sensibile, de generația a 3-a, sînt *diagnosticul radioimunologic* și *enzimoimunologic*. Toate tehnicile confirmă lipsa de relație imunologică între hepatitele A și B.

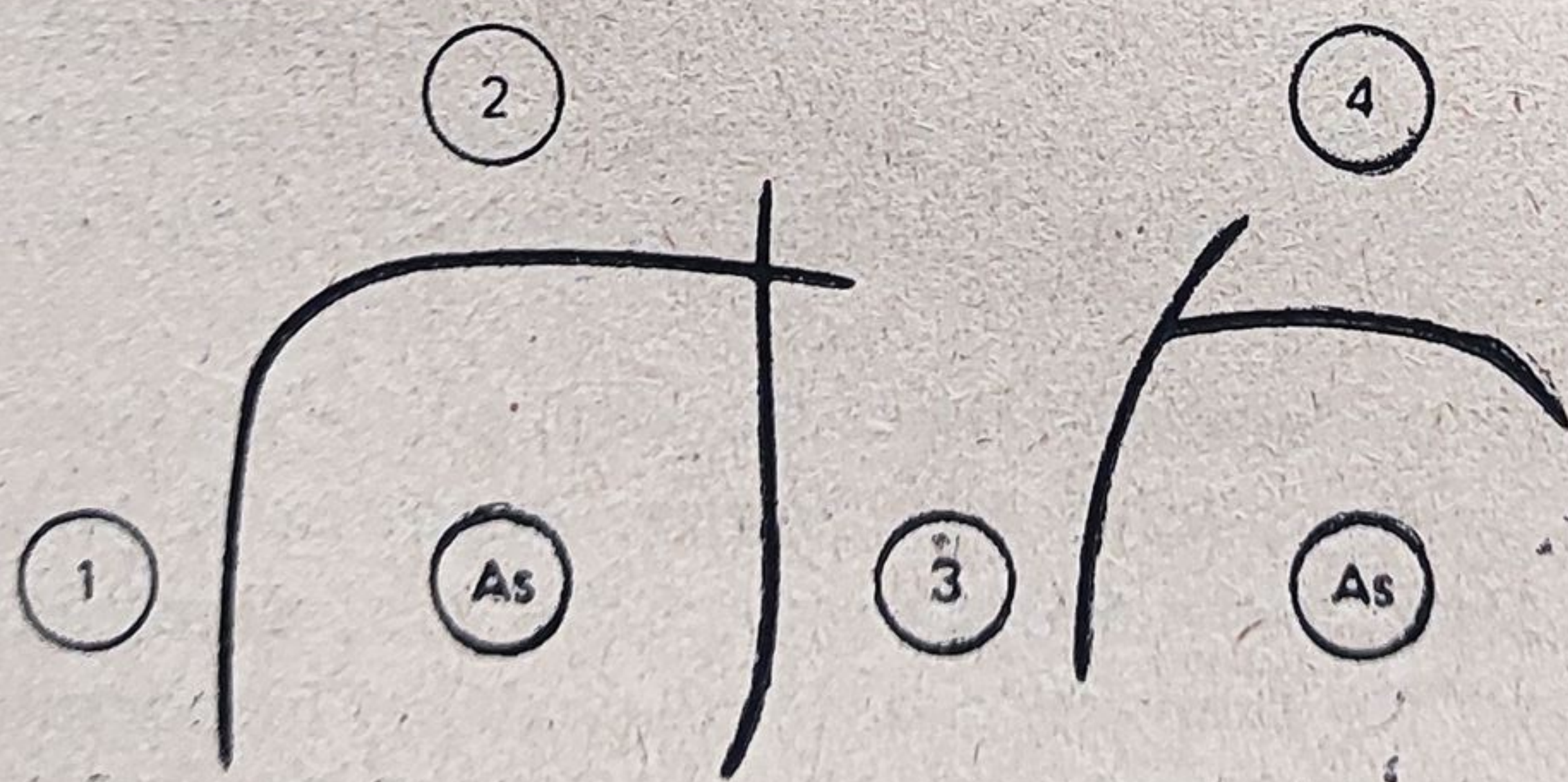


Fig. 21. Reacție de imunodifuzie :

As — antiser ; 1, 2, 3 și 4 — godeuri cu antigene ; între 1 și 2 — reacție de identitate ; între 3 și 4 — reacție de identitate parțială ; între 2 și 3 — reacție de non-identitate.

Calea de transmitere pentru hepatita B este parenterală. Ea a fost etichetată în trecut drept hepatită „de seringă”. Sterilizarea instrumentarului medical trebuie să țină seamă de rezistența deosebită a virusurilor hepatitice, pentru a se exclude riscul transmiterii iatrogene. Totodată, trebuie avut în vedere pericolul

transmiterii hepatitei B în cazul folosirii nediscriminate a transfuziilor de sânge sau a derivatelor de sânge. O particularitate a vindecării după hepatita B este apariția stării de purtător, adică a infecției persistente cu virus. Acești purtători reprezintă rezervorul de virus pentru perpetuarea lanțului epidemiologic. Starea de purtător nu este fără urmări pentru bolnav. Frecvent, se ajunge la hepatită cronică și ciroză.

Hepatita delta este urmarea suprainfecției bolnavilor cronici de hepatită B cu un virus defectiv, virusul delta. Virusurile defective nu se pot replica decât în prezența unor „virusuri ajutătoare” și, de regulă, complică evoluția hepatitelor cronice.

Tema 36

MONONUCLEOZA INFECȚIOASĂ

Mononucleoza infecțioasă (MI) este o infecție a copilăriei, cu evoluție benignă. Agentul etiologic al bolii este *virusul Epstein-Barr* (din grupul gammaherpesvirusuri).

Acest agent a fost implicat în etiologia a două boli maligne umane: limfomul Burkitt și carcinomul nazofaringian, ceea ce a stimulat enorm studiul său.

Virusul Epstein-Barr este virus ADN, cu un spectru de gazdă îngust (infectează numai primatele) și, mai mult, se replică productiv numai în țesutul limfoid. Infecția latentă este obișnuită. Replicarea virusului în limfocite conferă acestora capacitatea de diviziune activă prin mitoze. Mulți cercetători interpretează MI ca o leucemie autolimitată, prin dezvoltarea imunității specifice antivirale.

MI este o infecție aerogenă cu incubatie lungă (45 zile). În perioada de stare se remarcă: febră, adenopatii, erupții cutanate. Tabloul sanguin este caracteristic: leucocitoză care poate varia între 20—80 000 elemente/mm³. Creșterea vizează limfocitele și monocitele; polimorfonuclearele scad. Frecvent, în sângele periferic se întâlnesc celule limfoblastoide mari și limfomonocite.

În afara tabloului sanguin, testul standard pentru diagnostic este reacția Hăngănuțiu—Paul—Bunnet—Davidson. Tehnica reacției este următoarea : serul bolnavului, inactivat 30 min la 56°C, servește pentru efectuarea de diluții binare ; diluțiile sînt incubate cu o suspensie 1% de hematii proaspete de berbec pentru 2 ore la 37°C și, în continuare, peste noapte, la +4°C. În acest mod se pun în evidență aglutinine (heterofile), care au valoarea diagnostică la un titru ce depășește 1/100. Reacția poate deveni mai sensibilă dacă înaintea aglutinării serurile sînt adsorbite cu eritrocite bovine și, respectiv, extract de rinichi de cobai. Aglutininele nespecifice sînt îndepărtate de adsorbția pe rinichi de cobai, în timp ce aglutininele din MI sînt îndepărtate de adsorbția pe hematiile bovine. Numai 60—70% din cazurile diagnosticate clinic și hematologic sînt pozitive în reacția Hăngănuțiu. Astăzi se pot evidenția, prin imunofluorescență sau alte teste imunologice, anticorpii antivirul Epstein-Barr, care sînt mult mai specifici.

MI este o infecție foarte răspîndită, majoritatea adolescenților avînd anticorpi specifici. Sînt foarte frecvente formele de boală inaparente. Relația etiologică a virusului Epstein-Barr cu cele două afecțiuni maligne menționate mai sus nu este certă și, în orice caz, infecția mononucleozică nu a fost asociată cu vreun risc cancerigen. Din punct de vedere teoretic, însă, studiul replicării virusului a evidențiat un posibil model de carcinogeneză virală : integrarea genomului viral în cel celular și, pe această cale, modificarea celulelor infectate.

Tema 37

SINDROMUL DE IMUNODEFICIT DOBÎNDIT (SIDA)

O varietate de virusuri se pot transmite și pe cale sexuală : virusul herpetic, virusul hepatitei B, virusul imunodeficienței umane (HIV) etc. Virusul imunodeficienței umane este un retrovirus (v. tab. 2), adică un virus ARN care, posedînd reverstranscriptază, realizează în cursul replicării un stadiu de provirus ADN care se poate integra în genomul celulei-gazdă. Virusul HIV infectează și distruge limfocitele T, compromițînd capacitatea de apărare imună a organismului. De la data infecției și pînă la apariția semnelor cli-

nice ale SIDA se poate scurge o perioadă lungă de incubatie, de câțiva ani. În tot acest interval subiectul este contagios, în ciuda faptului că el este aparent sănătos.

Boala clinic manifestă se caracterizează prin evoluția severă a unor infecții sau afecțiuni maligne și este letală după 1—2 ani. În afara transmiterii sexuale, SIDA se mai transmite de la mama infectată la făt sau în urma transfuziilor de sânge ori a administrării parenterale a derivatelor de sânge contaminate.

Diagnosticul de laborator vizează, în primul rând, decelarea bolnavilor infectați în stadiile timpurii ale bolii, sau chiar înaintea apariției semnelor de boală. Aceasta se realizează prin detectarea anticorpilor specifici prin metode imunoenzimatice. Excluderea celor cu anticorpi din rândul donatorilor de sânge evită transmiterea bolii prin acest act medical.

În lipsa unor posibilități eficiente de tratament, educația sexuală, în special a adulților tineri, rămîne singura armă eficientă în împiedicarea răspîndirii acestei teribile boli, care a provocat în numai câțiva ani peste 100 000 victime.

Tema 38

GRUPUL PSITTACOZA (ORNITOZA)

Agenții patogeni ai trahomului, ai conjunctivitei și uretritei cu incluziuni, ai limfogranulomatozei inghinale benigne și ai psittacozei formează un grup unitar desemnat sub numele generic de *Chlamydiae*.

Chlamidiile și rickettsiile (v. tema 39) au fost altădată considerate virusuri; în fapt, există importante deosebiri între ele și virusuri sau bacterii (v. tab. 1).

Cîteva caracteristici ale chlamidiilor și rickettsiilor vor fi precizate în continuare, urmînd ca descrierea afecțiunilor umane să fie dată la capitolele respective. Ciclul de creștere și multiplicare este caracteristic acestor agenți. Particula infectantă, numită *corpuscul elementar* (0,3 μ în diametru), pătrunde în celula-gazdă prin fagocitoză. Aici își pierde nucleoidul și se transformă într-o structură mai mare, *corpuscul inițial* (0,5—1 μ), care nu este infectant. Corpusculul inițial se divide repetat, producînd *progenii*. Ultimii se maturează în noi corpusculi elementari infectanți.

Caracteristic îmbolnăvirilor cu germenii chlamidieni și rickettsieni, atât la om cât și la animale, este stabilirea unui echilibru parazit-gazdă, rezultând o stare de purtător clinic sănătos, care este, însă, excretor permanent de germeni.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu acești germeni utilizează următoarele tehnici :

— *izolarea germenilor efectuată pe oul de găină embrionat, inoculat în sacul vitelin*. Sînt necesare cîteva treceri „oarbe“ pînă cînd agentul se adaptează la acest nou sistem parazit-gazdă și produce cantități semnificative de germeni și leziuni caracteristice (incluziuni) ;

— *colorarea germenilor pe secțiuni histologice* evidențiază, în fiecare stadiu al multiplicării, afinități tinctoriale diferite. Corpusculul elementar se colorează roșu cu tehnica Macchiavello și purpuriu cu Giemsa, în contrast cu fondul albastru al citoplasmei celei-gazdă. Incluziunile celulare se colorează, de asemenea, purpuriu cu Giemsa, pe cînd corpusculii inițiali se colorează albastru ;

— *identificarea germenilor făcută prin RFC, imunofluorescență sau reacția de microaglutinare* (pe lamă sau în tuburi). Tehnica ultimei reacții este simplă, iar rezultatele specifice. Se prepară amestecuri din diluții de ser cu antigen, care se mențin 18 ore la 20°C în cameră umedă. Apoi lamele se usucă și se colorează Giemsa, apreciindu-se la microscopul obișnuit gradul de aglutinare al corpusculilor elementari.

38.1. PSITTACOZA (ORNITOZA)

Termenul de *psittacoză* se aplică infecțiilor umane cu germeni chlamidieni dobîndite de la păsări ; termenul de *ornitoză* este rezervat aceluiași infecții la păsări. Psittacoza este o afecțiune cu caracter epidemic sau endemic, provocînd infecții pulmonare cu aspect de pneumonie virotică. Incubația este de 10 zile, iar vindecarea — sub tratament cu tetracicline — se obține în 1—2 săptămîni. Probabilitatea unei psittacoze, trebuie avută în vedere cînd subiectul, prin ocupația sa, vine în contact cu păsări sau cînd în anturaj sînt crescute păsări.

38.2. CONJUNCTIVITA ȘI URETRITA CU INCLUZIUNI

Conjunctivita și uretrita cu incluziuni sînt produse de un agent chlamidian similar, dacă nu identic, cu cel al trahomului (vezi mai jos), denumit *agentul TRIC* (*trahom* — conjunctivită cu incluziuni).

Conjunctivita cu incluziuni este, epidemiologic vorbind, secundară infecției tractului genital. Agentul crește în epiteliul colului la femei și al uretrei la bărbați. Ochiul se contaminează în cursul nașterii sau în bazinele de înot. La nou-născuți afecțiunea evoluează ca o conjunctivită purulentă; la adulți infecția apare mai ales vara, ca o conjunctivită limitată ce nu afectează corneea. Uretrita recunoaște o cale de transmitere venerică. Tratamentul cu tetraciclina este util.

38.3. TRAHOMUL

Trahomul este o keratoconjunctivită cronică răspândită în Asia și Africa. Aproximativ 400 milioane oameni sînt infectați și se apreciază că 20 milioane de orbi își dătoresc infirmitatea acestei afecțiuni. Semnele inițiale ale trahomului sînt: *lăcrimarea, hiperemia conjunctivală, hipertrofia foliculară*. De obicei, datorită igienei deficitare, apare o *secreție conjunctivală mucopurulentă*. Examinarea corneei evidențiază leziunile cele mai grave care pot duce la orbire: *keratita epitelială, infiltrația subepitelială, vascularizarea și opacifierea corneei* (panus). Trahomul difuzează prin contact, prin mîini murdare, prosoape, cosmetice. Imunitatea nu este însoțită de sterilizarea organismului. De aceea, vindecarea este frecvent însoțită de apariția stării de purtător. Tetraciclinele aplicate local, o dată cu sulfonamidele pe cale generală, dau bune rezultate. De asemenea, o serie de vaccinuri s-au dovedit eficiente în profilaxia bolii.

38.4. LIMFOGRANULOMATOZA INGHINALĂ BENIGNĂ

Limfogranulomatoza inghinală benignă sau veneriană (LGV) este caracterizată de *inflamația supurativă a ganglionilor limfatici*. Boala evoluează în trei stadii:

- *primar* — șancru limfogranulomatos constînd din leziuni papulare pe tegumentele genitale;
- *secundar* — adenopatii inghinale;
- *terțiar* — sindrom genital și anorectal, ca urmare a stricturilor și a edemelor elefantiazice.

Transmiterea bolii este venerică, iar ca metode de profilaxie și combatere se utilizează strategia din infecțiile luetice sau gonococice. Tratamentul cu tetraciclina a îmbunătățit prognosticul bolii, deși au început să apară tulpini rezistente la antibiotice.

O tehnică utilă de diagnostic este evidențierea hipersensibilității cutanate — *testul Frey*. Consecutiv injectării intradermice a

0,1 ml dintr-o suspensie inactivată prin căldură de germeni LGV, apare la 2—3 zile un nodul inflamator. Testul Frey rămîne pozitiv mult timp după rezolvarea infecției acute.

Tema 39

GENUL RICKETTSIA ȘI RICKETTSIOZELE

Rezervorul natural pentru rickettsii îl constituie artropodele, insecte în care germenii se divid fără a provoca boală și care constituie vectori în lanțul epidemiologic al rickettsiozelor. Când germenii infectează omul, determină afecțiuni variate, ce au fost schematizate în tabelul 12.

Tabelul 12

Clasificarea rickettsiilor și a rickettsiozelor*

Grupul	Agentul și boala	Sursa de infecție	Modul de transmitere	Semnele clinice	Incubația (zile)
Tifos exantematic	— R. prowazeki — tifos epidemic	păduche uman, reîmbolnăvire**	înțepătura pielii produsă de păduche	erupție, stare tifică, colaps	12
	— R. mooseri-tifos endemic	purice de șobolan	transcutan prin grataj	erupție, febră	14
Febre pătate	— R. conori — febră butonoasă	căpușă de ciine	înțepătura pielii	erupție, febră	7
Rickettsioze pulmonare	— R. burneti — febra Q	lapte, dejecții, secreții de la animale bolnave	toate căile	febră, pneumonie	14
Rickettsioze recurențiale	— R. quintana — febra de tranșee	păduche uman	transcutan	febră, erupție, alții	14

* Nu au fost incluse rickettsioze care nu sînt întâlnite în Europa.

** Tifosul de reîmbolnăvire (boala Brill-Zinsser) este o recădere a unui tifos exantematic vechi, în care rickettsiile persistente își recapătă virulența.

Locul de elecție al multiplicării rickettsiilor la om este endote-liul capilarelor sanguine, determinînd necroze, rupturi și tromboze vasculare. Leziunile vasculare din derm sînt cauza erupțiilor care însoțesc frecvent aceste boli. Aceleași leziuni pot determina suferința miocardului sau tulburări în circulația feto-placentară cu avorturi consecutive.

39.1. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR

De la început trebuie reținut că tehnicile de izolare ale rickettsiilor prezintă un risc important pentru personalul laboratoarelor. Izolarea se face din sînge (în prima săptămîină de boală) pe oul embrionat (intraamniotic) sau pe cobai ori șoarece (intraperitoneal). Exsudatul peritoneal conține celule în care germenii rickettsieni pot fi evidențiați prin colorațiile Machiavello sau Giemsa.

Reacțiile serologice în rickettsioze se bazează pe depistarea anticorpilor fixatori de complement sau aglutinanți, dar și pe evidențierea unor anticorpi care aglutinează anumite tulpini de *Proteus vulgaris*. Există înrudiri antigenice între rickettsii și *P. vulgaris*, fapt pe care se bazează reacția *Weil-Felix*. Tehnica reacției constă în incubarea diluțiilor de ser cu o suspensie conținînd antigenul alcoolat de *P. vulgaris*. Citirile se fac după incubare timp de 2 ore la 37°C și peste noapte la temperatura camerei. Aglutinarea netă, cu depozit granular pe fundul tubului, denotă reacție pozitivă. Titrurile peste 1/200 au valoarea diagnostică.

39.2. EPIDEMIOLOGIE, PROFILAXIE

Controlul rickettsiozelor trebuie să țină seamă de ecologia insectelor vectoare. Măsurile de profilaxie vizează, în primul rînd, depa-razitarea prin utilizarea unor insecticide remanente. Pentru profila-xia infecțiilor de laborator există vaccinuri formolate eficiente. În cazul foștilor bolnavi trebuie urmărită sterilizarea organismului de germenii efectuată, ca și în cazul chlamidiilor, prin tratament ener-gic cu tetraciline. Infecția persistentă cu rickettsii a fost incrimi-nată în patogenia unor avorturi, infarcte de miocard, arterite.

CUPRINS

BACTERIOLOGIE

Tema	1. Noțiuni generale despre bacteriologie și inframicrobiologie	3
	1.1. Obiectul bacteriologiei și inframicrobiologiei	3
	1.2. Istoricul microbiologiei medicale	3
Tema	2. Morfologia și fiziologia bacteriilor	6
	2.1. Forma și modul de grupare, dimensiunile, structura și formele de rezistență ale bacteriilor	6
	2.2. Nutriție, medii de cultură, înmulțire	8
Tema	3. Sterilizarea și dezinfectia	12
	3.1. Sterilizarea prin căldură și alte metode fizice	12
	3.2. Antisepticele	13
Tema	4. Examenul morfologic al bacteriilor	14
	4.1. Examinarea preparatelor native	15
	4.2. Examinarea preparatelor colorate	16
Tema	5. Patogenitatea bacteriilor	19
	5.1. Virulență. Toxigeneză	19
	5.2. Infecție. Inflamație	20
Tema	6. Mijloace de apărare a organismului contra infecției	22
	6.1. Mijloace de apărare nespecifice	22
	6.2. Mijloace de apărare specifice (imunitatea)	23
Tema	7. Flora microbiană a organismului uman	25
	7.1. Flora normală a pielii	26
	7.2. Flora normală a căilor respiratorii superioare	26
	7.3. Flora normală a tubului digestiv	26
	7.4. Flora normală a vaginului	27
	7.5. Flora normală a uretrei	27
	7.6. Flora normală a ochiului	27
Tema	8. Examenul bacteriologic al secrețiilor purulente	28
	8.1. Stafilococul	29
	8.2. Streptococul	31
	8.3. Pneumococul	32
	8.4. Meningococul	33
	8.5. Gonococul	34
	8.6. Piocianicul	35
	8.7. Escherichia coli	35
	8.8. Proteusul	36
	8.9. Bacilul Friedländer	36
	8.10. Brucella	37
	8.11. Germenii gangrenei gazoase	37

Tema 9.	Examenul exsudatului faringian	38
9.1.	Tehnica de recoltare	39
9.2.	Examenul bacteriologic al exsudatului faringian	39
Tema 10.	Examenul bacteriologic al sputei	40
10.1.	Elemente celulare și necelulare	41
10.2.	Germeni și paraziți	42
Tema 11.	Examenul bacteriologic al secrețiilor genitale	45
11.1.	Sifilisul	45
11.2.	Gonoreea	47
11.3.	Șancrul moale	49
11.4.	Trichomonaza	49
11.5.	Candidioza	50
Tema 12.	Examenul bacteriologic al materiilor fecale	52
12.1.	Holera	53
12.2.	Salmoneloze	55
12.3.	Dizenteria bacilară	58
12.4.	Enterocolite produse de <i>Bacillus coli</i>	59
12.5.	Tuberculoza intestinală	59
Tema 13.	Examenul bacteriologic al urinei	61
Tema 14.	Examenul lichidului cefalorahidian, al sucului gastric și duodenal, al exsudatelor și transsudatelor	66
14.1.	Recoltarea lichidului cefalorahidian	66
14.2.	Examenul sucului gastric	68
14.3.	Examenul lichidului duodenal	69
14.4.	Examenul exsudatelor și transsudatelor	69
Tema 15.	Examenul bacteriologic și parazitologic al sîngelui	70
15.1.	Examenul bacteriologic al sîngelui	70
15.2.	Examenul parazitologic al sîngelui	74
Tema 16.	Examenul bacteriologic al apei	76
16.1.	Recoltarea și transportul apei pentru analiză	76
16.2.	Analiza cantitativă	76
16.3.	Analiza calitativă	77
16.4.	Identificarea germenilor patogeni	77
Tema 17.	Examenul bacteriologic al alimentelor	78
17.1.	Examenul bacteriologic al cărnii	78
17.2.	Examenul derivatelor din carne și mezelurilor	80
17.3.	Examenul bacteriologic al conservelor	80
17.4.	Examenul bacteriologic al ouălor	80
17.5.	Examenul bacteriologic al laptelui	81
Tema 18.	Analiza bacteriologică a solului și aerului	82
18.1.	Analiza bacteriologică a solului	82
18.2.	Analiza bacteriologică a aerului	83
Tema 19.	Toxiinfecțiile alimentare	84
19.1.	Toxiinfecțiile alimentare de tip infecțios	85
19.2.	Toxiinfecțiile alimentare de tip toxic	87
19.3.	Profilaxia toxiinfecțiilor alimentare	89

Tema 20. Infecțiile intraspitalicești	90
20.1. Controlul bacteriologic al personalului medico-sanitar și al bolnavilor	90
20.2. Controlul microbiologic al sterilizării și al sterilității	92
20.3. Controlul microbiologic al condițiilor igienico-sanitare	94
20.4. Controlul microbiologic al suprafețelor și inventarului moale	95
20.5. Controlul utilajului din blocurile alimentare	96
20.6. Profilaxia infecțiilor intraspitalicești	97

INFRAMICROBIOLOGIE

Tema 21. Generalități asupra virusurilor	98
21.1. Caractere generale ale virusurilor	99
21.2. Clasificarea virusurilor	101
21.3. Metode de lucru folosite în inframicrobiologie	101
Tema 22. Morfologia, structura și compoziția chimică a virusurilor	102
22.1. Structura internă a virionului	102
22.2. Compoziția chimică a virusurilor	103
Tema 23. Acțiunea agenților fizici și chimici asupra virusurilor	104
23.1. Agenți fizici și chimici	104
23.2. Modul de acțiune asupra virusurilor	105
Tema 24. Cultivarea virusurilor	106
24.1. Recoltarea produselor patologice de la om	106
24.2. Cultivarea virusurilor pe animale de laborator	108
24.3. Recoltarea materialelor de la animalele de laborator inoculate	109
24.4. Cultivarea virusurilor pe ouă embrionate	110
24.5. Recoltarea diferitelor componente ale oului embrionat	110
24.6. Cultivarea virusurilor pe culturi de celule	111
Tema 25. Multiplicarea virusurilor	112
25.1. Fazele de multiplicare ale bacteriofagilor și ale virusurilor animale	113
25.2. Interferență, interferon	114
Tema 26. Imunitatea în infecția virotică	114
26.1. Mecanismele rezistenței nespecifice	115
26.2. Imunitatea	115
Tema 27. Reacții serologice în inframicrobiologie	116
27.1. Reacția de fixare a complementului	117
27.2. Reacția de hemaglutinare	118
27.3. Reacția de hemaglutinoinhibare	120
27.4. Reacția de seroneutralizare	121
27.5. Reacția de aglutinare la rece	122
Tema 28. Viroze ale aparatului respirator	123
28.1. Gripa	123
28.2. Guturaiul	126
28.3. Adenovirozele	126
28.4. Pneumopatiile virotice	127

Tema 29. Parotidita epidemică (oreionul)	127
Tema 30. Viroze eruptive	128
30.1. Variola — vaccina	129
30.2. Varicela. Zona zoster	130
30.3. Herpesul	130
Tema 31. Rujeola și rubeola	131
31.1. Rujeola	132
31.2. Rubeola	132
Tema 32. Enteroviroze	133
32.1. Poliomielite	134
32.2. Infecții cu virusuri Coxsackie	135
32.3. Virusurile ECHO	135
Tema 33. Febra aftoasă la om	136
Tema 34. Rabia (turbarea)	137
34.1. Virusul rabie	137
34.2. Diagnosticul de laborator	138
34.3. Profilaxia turbării la om și animale	138
Tema 35. Hepatitele epidemice virale	139
35.1. Hepatita A	139
35.2. Hepatita B	140
Tema 36. Mononucleoza infecțioasă	141
Tema 37. Sindromul de imunodeficit dobândit (SIDA)	142
Tema 38. Grupul psittacoza (Ornitoza)	143
38.1. Psittacoza (Ornitoza)	144
38.3. Trahomul	145
37.3. Trahomul	145
38.4. Limfogranulomatoza inghinală benignă	145
Tema 39. Genul Rickettsia și rickettsiozele	146
39.1. Diagnosticul de laborator	147
39.2. Epidemiologie, profilaxie	147